

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program:

Biologie

Studijní obor:

Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Tomáš Hofman

Vliv malých DNA virů na regulaci tvorby interferónu

Effect of small DNA viruses on regulation of interferon production

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: doc. RNDr. Ivan Hirsch, Csc.

Konzultant: Mgr. Václav Janovec

Praha 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracoval samostatně a uvedl veškeré zdroje a literaturu, ze které bylo čerpáno. Zároveň tato práce ani její část nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 30.4.2018

Podpis

Poděkování:

Zde bych rád poděkoval svému školiteli **doc. RNDr. Ivanu Hirschovi, CSc.**, za vstřícnost, vedení této práce a cenné rady nejen při jejím sepisování. Dále bych chtěl poděkovat **doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc.**, v jejíž laboratoři mi bylo umožněno tuto práci vypracovat. Další dík patří **Mgr. Vojtěchu Šrollerovi, Ph.D.** za ochotné zodpovězení mých dotěrných dotazů, **Mgr. Martinu Fraiberkovi, Ph.D** za věnování kávovaru do laboratorní kuchyňky a taktéž i všem kolegům z laboratoře virologie.

Největší poděkování však patří **Mgr. Václavu Janovcovi** za design a experimentální vedení této práce, zaučení mě v laboratorních metodách a za ochotu, důvěru a veškerý čas, který mi věnoval.

Speciální poděkování patří mé **rodině, přítelkyni a přátelům**, bez jejichž podpory by tato práce nemohla vzniknout.

Abstrakt

Plasmacytoidní dendritické buňky (pDC) jsou buňky vrozené imunity, schopné rozpoznat viry pomocí jejich endosomálních Toll-like receptorů 7 a 9 (TLR7/9). Po rozpoznání virové nukleové kyseliny dochází k masivní produkci interferonu typu I (IFN I) a navození antivirového stavu v neinfikovaných buňkách. Aktivace regulačních povrchových receptorů pDC, jako je BDCA-2, pomocí monoklonální protilátky nebo jejich ligace některými viry vede k aktivaci MEK1/2-ERK signalizace a inhibici produkce IFN I. V této práci byla vyzdvihnuta role MEK1/2 kinázy, jejíž inhibice zvrátí inhibiční účinek ligace BDCA-2 a jejíž cílená aktivace pomocí PMA vede k inhibici produkce IFN- α . Hlavním cílem této práce bylo objasnění vlivu BK polyomaviru (BKV), zodpovědného za odhojování transplantovaných jater, na pDC. Experimenty s pDC linií Gen2.2 a primární linií buněk ledvin HRPTEC ukázaly, že pDC nejsou schopny přímé detekce BKV částic, avšak BKV inokulum dramaticky potenciuje produkci IFN- α v aktivovaných buňkách Gen2.2. Kokultivace buněk Gen2.2 s BKV infikovanými buňkami HRPTEC vedla k produkci IFN- α a ve větší míře TNF- α , které bylo zabráněno užitím Bafilomycinu. V souhrnu bylo zjištěno, že detekce BKV infikovaných buněk HRPTEC buňkami Gen2.2 vede k produkci cytokinů, která je závislá na buněčném kontaktu a je pravděpodobně zprostředkována endosomálními TLR7/9.

Klíčová slova: plasmacytoidní dendritické buňky, Toll-like receptory, BK polyomavirus, IFN- α , TNF- α , vrozená imunita, buněčný kontakt

Abstract

Plasmacytoid dendritic cells (pDC) represent innate immune cells capable to detect viruses in their endosomal environment via Toll-like receptors (TLRs). Viral nuclear acid recognition leads to the massive production of type I interferon (IFN I) and induction of the antiviral state in uninfected cells. Crosslinking of the surface regulatory receptors, such as BDCA-2, with monoclonal antibodies or with some viruses leads to the activation of MEK1/2-ERK signaling pathway and inhibition of IFN I production in pDC. In this study, the role of MEK1/2 kinase has been highlighted. Its inhibition reversed the inhibitory effect of BDCA-2 crosslinking and its direct activation with PMA led to the inhibition of IFN- α production. Yet an unclear role of pDC in sensing of BK polyomavirus virus (BKV) responsible for kidney transplant rejection was investigated as a major topic of this thesis. Experiments with the pDC cell line Gen2.2 and the HRPTEC primary cell line showed that pDCs were not able to detect BKV particles, however, exposure of activated Gen2.2 cells to BKV inoculum dramatically upregulated production of IFN- α . Most importantly, coculture of Gen2.2 cells with BKV-infected HRPTEC cells resulted in IFN- α and TNF- α production, which was prevented by Bafilomycin. These results suggest that BKV-infected HRPTEC cells are detected by cell-to-cell contact with Gen2.2 cells resulting in TLR7/9-mediated IFN-I and proinflammatory cytokine production.

Key words: plasmacytoid dendritic cells, Toll-like receptors, BK polyomavirus, IFN- α , TNF- α , innate immunity, cell-cell contact

Obsah

1	ÚVOD.....	1
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
2.1	BK polyomavirus	2
2.1.1	Genom.....	2
2.1.1.1	Časná oblast.....	2
2.1.1.2	Pozdní oblast	3
2.1.2	Životní cyklus	4
2.1.3	Infekce	5
2.1.4	Patogeneze BKV	5
2.1.5	Vliv polyomavirů na buněčnou signalizaci	6
2.1.5.1	LT	6
2.1.5.2	ST	7
2.2	Molekulární složky antivirové vrozené imunity	8
2.2.1	Antivirové receptory vrozené imunity	8
2.2.2	Interferony	9
2.2.2.1	Typ I	10
2.2.2.2	Typ II.....	10
2.2.2.3	Typ III.....	11
2.2.3	Prozánětlivé cytokiny TNF- α a IL-6.....	11
2.2.4	Interferonem stimulované geny	11
2.2.5	BK virus a interferon	12
2.3	Buněčné složky antivirové vrozené imunity	13
2.3.1	Plasmacytoidní dendritické buňky.....	13
2.3.1.1	Vývoj, fenotyp a lokalizace	13
2.3.1.2	Produkce cytokinů	14
2.3.1.3	Antigenní prezentace	14
2.4	Interakce viru s plasmacytoidní dendritickou buňkou	16
2.4.1	Aktivace cytoplazmatických senzorů v pDC.....	16
2.4.2	Aktivace TLR7/9 v NF κ B a IRF7 endosomu pDC.....	18
2.4.3	Pozitivní zpětná vazba a JAK/STAT dráha	21
2.4.4	Inhibice interferonové dráhy.....	22
2.4.5	Buněčný kontakt	23
2.4.6	Exosomy	24
3	CÍLE PRÁCE	26
3.1	Část 1.....	26
3.2	Část 2.....	26
4	MATERIÁL A METODY	27
4.1	Materiál	27
4.1.1	Chemikálie	27

4.1.2	Bakteriální kmen a buněčné linie	27
4.1.3	Vir a virová inokula.....	28
4.1.4	Plasmidy	28
4.1.5	Primery	28
4.1.6	Markery molekulových vah	28
4.1.7	Enzymy.....	29
4.1.8	Inhibitory	29
4.1.9	Stimulanty	29
4.1.10	Protilátky	29
4.1.10.1	Primární protilátky	29
4.1.10.2	Sekundární protilátky	30
4.1.11	Kultivační média	30
4.1.11.1	Média pro savčí buňky	30
4.1.11.2	Média pro bakteriální kmeny	30
4.1.12	Používané roztoky	30
4.1.13	Komerční soupravy a roztoky	31
4.2	Metody.....	31
4.2.1	Práce s bakteriemi	31
4.2.1.1	Příprava kompetentních buněk pro elektroporaci	31
4.2.1.2	Elektroporace a kultivace transformovaných buněk.....	32
4.2.1.3	Příprava bakteriálních konzerv	32
4.2.2	Práce s buněčnými liniemi	32
4.2.2.1	Kultivace buněk MS5	32
4.2.2.2	Kultivace buněk Gen2.2.....	33
4.2.2.3	Počítání buněk Gen2.2	33
4.2.2.4	Testování inhibitorů signálních komponent, BKV a stimulace buněk Gen2.2	33
4.2.2.5	Kultivace buněk HRPTEC	34
4.2.2.6	Tvorba konzerv buněk HRPTEC	34
4.2.2.7	Infekce buněk HRPTEC a pomnožení viru BKV	34
4.2.2.8	Kokultivace HRPTEC s Gen2.2	35
4.2.3	Práce s primárními buňkami	35
4.2.3.1	Izolace PBMC	35
4.2.3.2	Testování inhibitorů signálních komponent a stimulace PBMC	36
4.2.4	Práce s DNA	36
4.2.4.1	Izolace plasmidu	36
4.2.4.2	Stanovení koncentrace plasmidu.....	36
4.2.4.3	Štěpení plasmidu restriční endonukleázou.....	36
4.2.4.4	PCR	37
4.2.4.5	Agarózová elektroforéza	37
4.2.4.6	Kvantifikace genomových ekvivalentů BKV v inokulu pomocí metody real time PCR	38
4.2.5	Práce s proteiny	38
4.2.5.1	Příprava buněčného lyzátu	38

4.2.5.2	SDS polyakrylamidová elektroforéza.....	39
4.2.5.3	Western blot.....	39
4.2.5.4	Imunodetekce proteinů na membráně	40
4.2.5.5	Detekce cytokinů pomocí ELISA metody.....	40
4.2.5.6	Fixace a permeabilizace buněk.....	41
4.2.5.7	Imunofluorescenční značení.....	41
4.2.5.8	Určení imunofluorescenčního titru.....	41
4.2.6	Sterilizace laboratorních potřeb a roztoků	42
5	VÝSLEDKY.....	43
5.1	ČÁST 1 - Charakterizace TLR signální kaskády u pDC	43
5.1.1	Vliv inhibitorů signálních drah na produkci cytokinů	43
5.1.2	Vliv MEK1/2 kinázy na produkci IFN- α	46
5.2	ČÁST 2 – Vliv BK viru na pDC	49
5.2.1	Charakterizace a infektivita BKV virových inokul	49
5.2.2	Schopnost BK viru aktivovat pDC	54
5.2.3	Vliv BK viru na aktivované Gen2.2 a PBMC	54
5.2.4	Detekce BKV infikovaných HRPTEC	56
5.2.5	Použití inhibitorů endozomální acidifikace	61
5.2.6	Použití transwellové komůrky	62
6	DISKUZE	64
6.1	Klíčové komponenty TLR signální kaskády u pDC	64
6.2	Rozpoznání BK viru pDC	65
7	SOUHRN.....	70
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	71

SEZNAM ZKRATEK

API	-	aktivační protein 1
APC	-	antigen presenting cells (antigen prezentující buňky)
BDCA-2	-	blood dendritic cell antigen 2 (krevní antigen dendritických buněk 2)
BKV	-	BK virus
BSA	-	bovinní sérum albumin
BTK	-	Brutonova tyrosin kináza
CARD	-	caspase activation and recruitment domain (kaspázu aktivující a vazebná doména)
CaN	-	kalcineurin
DAPI	-	4,6-diamidino-2-fenylindol dihydrochlorid
DC	-	dendritic cells (dendritické buňky)
DC-SIGN	-	dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin
DCIR	-	dendritic cell immunoreceptor (imunoreceptor dendritických buněk)
dd H ₂ O	-	demineralizovaná destilovaná voda
DMSO	-	dimethylsulfoxid
DNA	-	deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
dpi	-	dny po infekci
EDTA	-	ethylenediaminetetraacetic acid (kyselina ethylendiamintetraoctová)
ELISA	-	enzyme-linked immunosorbent assay
ER	-	endoplazmatické retikulum
ERK	-	extracelulárním signálem regulovaná kináza
FADD	-	Fas-associated protein with death domain (Fas asociovaný protein s doménou smrti)
FBS	-	fetální bovinní sérum
FFU	-	fluorescent forming unit
FV	-	foamy virus (pěnivý virus)
GE	-	genomové ekvivalenty
GAS	-	gamma-activated site (interferonem gamma aktivovaný úsek)
HBV	-	hepatitis B virus (virus žloutenky B)
HCV	-	hepatitis C virus (virus žloutenky C)
HCMV	-	lidský cytomegalovirus
HIV	-	human immunodeficiency virus (virus lidské imunodeficiency)
HRPTEC	-	human renal proximal tubul epithelial cells (lidské buňky z renálních proximálních tubulů ledvin)
HSV-1	-	lidský herpesvirus 1
IFN- α	-	interferon alfa
IFN I, II, III	-	interferon typu I, typu II, typu III
IFNAR	-	interferon alfa receptor
IFNGR	-	interferon gamma receptor
I κ B	-	inhibitor κ B
IKK	-	inhibitor κ B kinázy
IL-6	-	interleukin 6
IL3R	-	interleukin 3 receptor
ILT7	-	immunoglobulin-like transcript
IPS-1	-	IFN- β promoter stimulator 1 (stimulátor IFN- β promotoru)
IRAK	-	s interleukin-1 receptorem asociovaná kináza
IRF	-	interferon regulující faktor
ISG	-	interferonem stimulované geny
ISRE	-	interferon stimulated response element (elementy interferonem stimulované odpovědi)

JAK	-	Janus kináza
JCV	-	JC virus
JNK	-	c-jun N-terminální kináza
kDa	-	kilo Dalton
LCMV	-	lymfotropní choringomeningitis virus
LT	-	large T antigen (velký T antigen)
MAPK	-	mitogen-activated protein kinases (mitogenem aktivované proteinkinázy)
MDA5	-	Melanoma Differentiation-Associated protein 5 (protein asociovaný s diferenciací v melanom 5)
MEK1/2	-	MAPK/Erk kináza 1/2
MCV	-	Merkel cell carcinoma virus (virus Merkelových buněk)
mDC	-	myeloid dendritic cells (myeloidní dendritické buňky)
MHC	-	major histocompatibility complex (hlavní histokompatibilní komplex)
mRNA	-	messenger RNA (mediátorová RNA)
NCCR	-	non-coding control region (nekódující kontrolní oblast)
NFκB	-	nuclear factor κB (jaderný faktor κB)
NK	-	negativní kontrola
NK buňka	-	natural killer („přirozený zabiják“)
OPN	-	osteopontin
PAMP	-	pathogen asociated molecular patter (vzor asociovaný s patogeny)
PBMC	-	peripheral blood mononuclear cells (periferní krevní mononukleární buňky)
PBS	-	phosphate buffered saline
PCR	-	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
pDC	-	plasmacytoid DC (plasmacytoidní dendritické buňky)
PMA	-	phorbol myristoyl acetát
PP2A	-	protein phosphatase 2 A (protein fosfatázy 2 A)
pRb	-	retinoblastomový protein
PRR	-	pattern recognition receptor (vzory rozpoznávající receptor)
PVAN	-	polyomavirus-associated nephropathy (s polyomaviry asociovaná nefropatie)
RIG-I	-	retinoic acid-inducible gene I (retinovou kyselinou indukovaný gen I)
RLR	-	RIG-I-like receptor
ss/dsRNA	-	single strand/double strand ribonucleic acid (jednovláknová/dvouvláknová ribonukleová kyselina)
rpm	-	rotate per minute (otáčky za minutu)
SOCS	-	supresor of cytokine signaling (supresor cytokinové signalizace)
ST	-	small T antigen (malý T antigen)
STAT	-	signální transduktor a aktivátor transkripce
STING	-	stimulátor interferonových genů
SV40	-	simian virus 40 (opičí virus 40)
TBK1	-	TANK-binding kinase 1 (TANK vazebná kináza 1)
TIR	-	Toll-Interleukin receptor
TLR	-	toll-like receptor
TNF-α	-	tumor necrosis factor α (faktor nekrotizující nádory alfa)
TRAIL	-	TNF-related apoptosis-inducing ligand (ligand obdobný TNF indukující apoptózu)
TRAF	-	s TNF receptorem asociovaný faktor
VP1	-	viral protein 1 (hlavní strukturní virový protein 1)
VP2,VP3	-	viral protein 2 a 3 (minoritní virový protein 2 a 3)

1 ÚVOD

Plasmacytoidní dendritické buňky (pDC) jsou důležitou složkou vrozené imunity. Tuto roli mají zejména díky schopnosti rychlé produkce vysokého množství IFN I po rozpoznání virové nukleové kyseliny pomocí endozomálních TLR3, TLR7 a TLR9. Rychlá produkce IFN I je také umožněna konstitutivní expresí klíčového transkripčního faktoru interferon response factor 7 (IRF7). Na svém povrchu obsahují pDC i množství regulačních receptorů, které tuto produkci po určité době zpětně regulují, aby nedošlo k nežádoucím účinkům vysokého množství IFN I. Aktivace regulačních receptorů představuje jednu z popsaných virových strategií imunitního úniku. Z tohoto důvodu se studium regulačních receptorů stalo cílem mnoha laboratoří, včetně naší, neboť odhalení klíčových komponent TLR signalizace a mechanismu regulace produkce IFN I může být průlomem v léčbě chronických virových onemocnění. Možným cílem je i léčba reaktivace perzistujících virů, například BK viru (BKV).

BKV je zástupcem lidských polyomavirů, jehož prevalence v populaci dosahuje až 90%. Prvotní infekce nastává v dětství a způsobuje nezávažné až asymptomatické projevy. Brzy po infekci virus přechází do perzistence v urogenitálním traktu a u zdravých jedinců nezpůsobuje vážné symptomy. Závažnost infekce BKV se může projevit zejména u pacientů po transplantaci ledvin, kdy v důsledku imunosuprese dochází k reaktivaci BKV a odhojení transplantátu. To, jakým způsobem je virus kontrolován imunitním systémem a jestli je rozpoznáván mechanismy vrozené imunity, zůstává neobjasněno. Tato práce se zabývá otázkou, zdali je BKV viditelný pro imunitní systém, konkrétně pro pDC. Objasnění interakce pDC by proto mohlo vést k objasnění patologií způsobených reaktivací viru u imunosuprimovaných pacientů.

Tato práce si klade za cíl přispět k poznání mechanismu regulace produkce IFN I v pDC a objasnit vztah BKV a pDC.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 BK polyomavirus

Člověk je hostitelem celkem deseti doposud popsáných polyomavirů, a sice BK viru (BKV), JC viru (JCV), KI viru, WU viru, viru Merkelových buněk (MCV), lidského polyomaviru 7, 8 a 9, trichodysplasia spinulosa viru a MW viru (Dalianis a Hirsch 2013). Polyomaviry jsou malé neobalené DNA viry. Nejznámějšími a nejzastoupenějšími polyomaviry u člověka jsou JCV a BKV, pojmenované podle imunosuprimovaných pacientů po transplantaci ledvin, z jejichž moči byly v roce 1971 poprvé vyizolovány (Gardner et al. 1971; Knowles et al. 2003; Padgett et al. 1971). BKV můžeme rozdělit do 4 subtypů, přičemž prevalence subtypu I dosahuje v populaci až 90% (Ikegaya et al. 2006; Jin et al. 1993a; Jin et al. 1993). Vysoká prevalence je pravděpodobně zapříčiněna dlouhou koevolucí BKV s hostitelem, schopností viru brzy přejít do latentní fáze a jeho nepříliš častou reaktivací, která u zdravého člověka není život ohrožující (Helle et al. 2017; Hirsch a Steiger 2003).

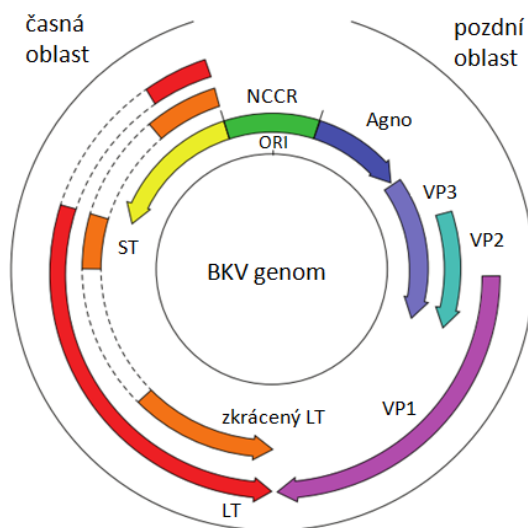
2.1.1 Genom

Genomem BKV je 5141 bp velká cirkulární dsDNA, která je v infikované buňce asociována s hostitelskými histony, formujících zhruba 20 nukleosomů. Polyomaviry mezi sebou sdílí vysokou homologii, u BKV s JCV je to až 75% a s více známým opičím virem SV40 je to 69%. Genom můžeme rozdělit na dvě vysoce konzervované oblasti, mezi sebou oddělené nekódující kontrolní oblastí (NCCR). První oblast obsahuje geny pro proteiny časně fáze a druhá oblast geny pro proteiny pozdní fáze (Obrázek 1) (Hirsch a Steiger 2003; Seif et al. 1979).

2.1.1.1 Časná oblast

Expresce časných genů nastává již 24 hodin po infekci a je nutná k zajištění zdárného průběhu pozdní genové exprese (Low et al. 2004). Časnými proteiny rozumíme velký tumorový protein (LT), malý tumorový protein (ST) a zkrácený T protein, které jsou exprimovány alternativním sestřihem mRNA (Abend et al. 2009). Tumorové proteiny nesou jaderný lokalizační signál, pomocí kterého jsou translokovány do jádra, ST však můžeme detekovat i v cytoplasmě. LT, jakožto hlavní regulační protein, obsahuje několik domén, které jsou schopny interakce s DNA a důležitými regulačními proteiny buněčného cyklu pRb a p53 (Harris et al. 1996; Harris et al. 1998). ST je rovněž

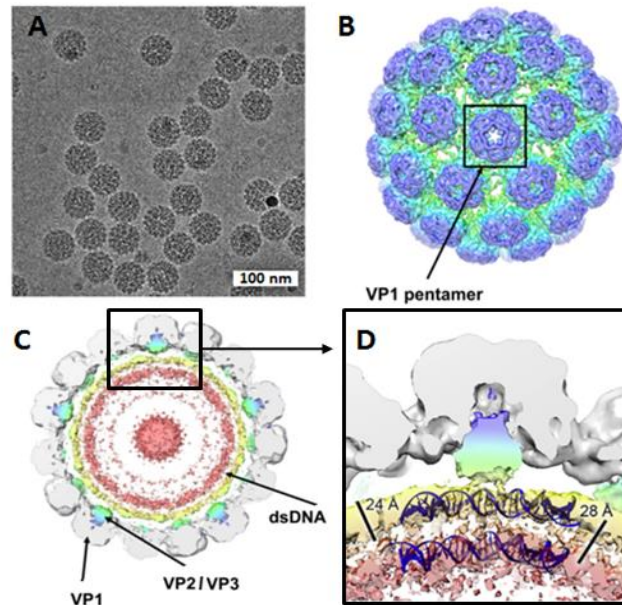
schopen inaktivace protein fosfatázy 2 A (PP2A) (Pallas et al. 1990) a spolu s LT významně ovlivňuje buněčný cyklus, DNA reparaci a apoptózu. Jelikož BKV genom nekóduje svou vlastní DNA závislou DNA polymerázu a ani jiné proteiny zúčastněné v DNA replikaci a transkripci, využívá hostitelské enzymy, jejichž expresi zvýší svými časnými proteiny (Helle et al. 2017).



Obrázek 1 Genom BK polyomaviru. Prvotní místo transkripce (ORI) je zahájeno z NCCR a dochází k přepisu časně oblasti kódující tumorový protein ST, LT a zkrácený LT. Po transkripci těchto nestrukturních proteinů dochází k přepisu pozdní oblasti kódující kapsidové proteiny VP1, VP2, VP3 a Agno protein. (Gascun a Carr 2013 - Upraveno).

2.1.1.2 Pozdní oblast

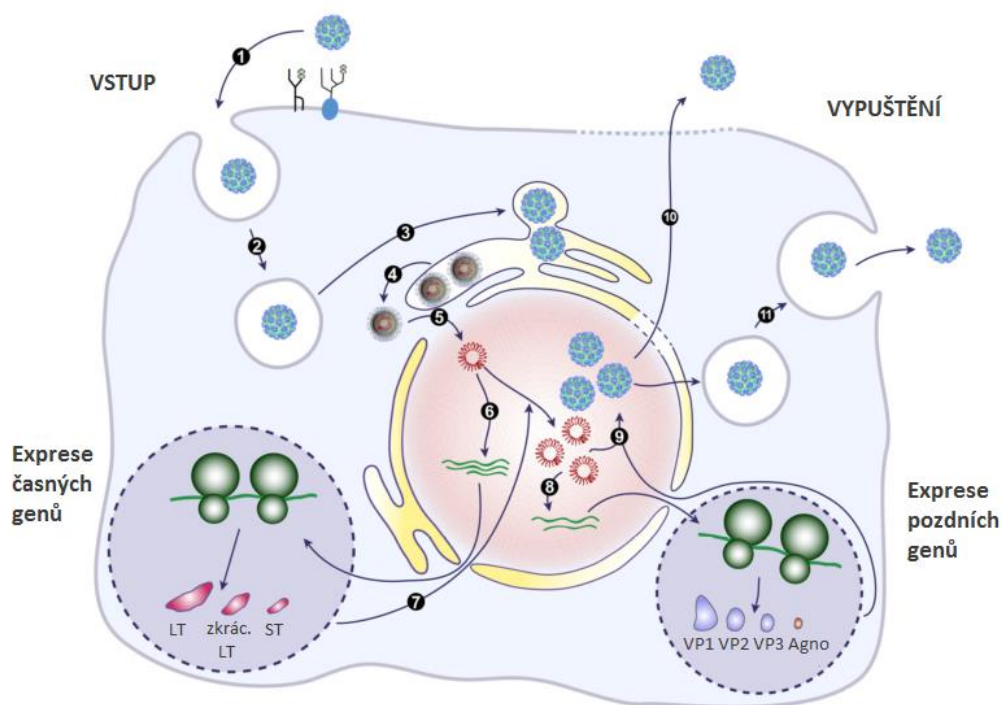
Geny pozdní fáze infekce jsou transkribovány po započetí replikace virové DNA přibližně 36 hodin po infekci (Low et al. 2004). Jedná se o kapsidové proteiny VP1, VP2, VP3 a Agno protein. VP1 je hlavním kapsidovým proteinem s počtem 360 molekul, tvořících 72 pentamer ikosahedrální kapsidy (Obrázek 2A,B). Uvnitř každé pentamery z VP1 se nachází hydrofobně ukotvený C-konec proteinu VP2 nebo VP3, směřující dovnitř kapsidy (Obrázek 2C,D) (Chen et al. 1998; Griffith et al. 1992; Rayment et al. 1982). VP2 a VP3 nejsou důležité pro stavbu samotné kapsidy, ale esenciální pro zdárnou infektivitu viru (Henriksen et al. 2016; Hurdiss et al. 2016). Agno protein je 8kDa protein lokalizovaný v cytoplasmě v časně fázi infekce. V pozdní fázi infekce se koncentruje do perinukleární oblasti. Hraje důležitou roli ve skládání kapsidy, její maturaci a následném vypuštění kompletních infekčních virionů (Johannessen et al. 2008; Okada et al. 2005; Renée et al. 2010; Rinaldo et al. 1998).



Obrázek 2 Struktura kapsidy BK polyomaviru. **(A)** Elektronová mikroskopie purifikovaných BKV virionů ve vrstvě sklovitého ledu. **(B)** Denzitometrická struktura a uspořádání VP1 pentamer tvořících virion BKV. **(C, D)** Denzitometrická vnitřní uspořádanost BK virionu. Šedivě VP1, modrozeleně VP2 a VP3, žlutě a červeně oblasti dsDNA (Hurdiss et al. 2016 - Upraveno).

2.1.2 Životní cyklus

Polysialované gangliosidy buňky mají důležitou roli receptoru pro BKV. Konkrétněji gangliosidy GD1b a GT1b nebo též N-vázaný glykoprotein obsahující $\alpha(2,3)$ -vázanou sialovou kyselinu jsou označeny za klíčové receptory pro VP1 a následný vstup BKV endocytosou přes caveolinové váčky do buňky (Dugan et al. 2005; Low et al. 2006; Moriyama et al. 2007; Zhao et al. 2016). Virion BKV poté směřuje přes endosomy a mikrotubuly do endoplazmatického retikula (ER). Z ER je částečně rozvolněná kapsida přenesena do cytoplasmy, odkud je virová DNA transportována pomocí importinu α/β přes jaderné póry do jádra (Bennet et al. 2015; Eash a Atwood 2005; Jiang et al. 2009; Takahito a Sorokin 2008). V jádře dochází k transkripci časných a pozdních genů a replikaci virové DNA. Po translaci virových mRNA v cytoplasmě jsou kapsidové proteiny díky jadernému lokalizačnímu signálu translokovány do jádra, kde se skládá kompletní virová částice. Ta je posléze transportována doposud neznámým mechanismem ven z buňky (Obrázek 3) (Helle et al. 2017).



Obrázek 3 Schéma životního cyklu BK viru. (1) Vstup BKV přes receptor; (2) endocytóza přes kaveolinové váčky; (3) transport do ER a částečné rozvolnění kapsidy; (4) transport částečně rozvolněné kapsidy do cytoplasmy; (5) transport virové DNA do jádra; (6) exprese časných genů a jejich translace (7) transport časných proteinů do jádra a zahájení replikace DNA; (8) exprese pozdních genů, translace a jejich transport do jádra; (9) složení virové částice; (10) vypuštění virionů lýzou buněk nebo (11) sekrecí přes váčky (Helle et al. 2017 - Upraveno)

2.1.3 Infekce

Infekce BKV nastává nejčastěji v dětství orální nebo respirační cestou a je ve většině případů asymptomatická. BKV se může přenášet transfúzí krve, transplantací orgánů nebo vertikálně z matky na dítě. Prvotní infekce nastává v mandlích, odkud je virus rozšířen přes infikované monocyty do dalších tkání a orgánů. Následně virus persistuje v urogenitálním traktu a epiteliálních buňkách ledvin s minimální replikací viru. Detekovat virus lze hlavně v moči, ale i v krvi a slinách. Reaktivace nastává hlavně u imunosuprimovaných pacientů po transplantaci ledvin či kostní dřeně (Boldorini et al. 2011; Chesters et al. 1983; Goudsmit et al. 1982; Hirsch a Steiger 2003; Jeffers et al. 2009)

2.1.4 Patogeneze BKV

Virus po primární infekci v dětství brzy přechází do stádia perzistence, přičemž nepůsobí klinické komplikace u zdravých jedinců. Problém nastává u pacientů

infikovaných virem lidské imunodeficiency (HIV), u pacientů po chemoterapii a terapeutické imunosupresi při transplantaci orgánů. U 5 % pacientů po transplantaci ledvin dochází k reaktivaci BKV, která má za následek tzv. polyomaviry asociovanou nefropatii ledvin (PVAN) vedoucí k odhojení a ztrátě orgánu u 50-70 % případů. Transplantace kostní dřeně může vést též ke vzniku hemoragické cystitidy. U pacientů s HIV lze v závislosti na stádiu HIV infekce a stavu imunitního systému pozorovat zvýšenou viremii a hlavně virurii BKV (Akhgari et al. 2015; Behzad-Behbahani et al. 2004; Binggeli et al. 2007; Fioriti et al. 2005; Gardner et al. 1984; Henrique et al. 2012; Hirsch et al. 2006; Hsiao et al. 2016; Kahan et al. 1980; Machado et al. 2011; Markowitz et al. 2016; Umbro et al. 2016). U některých typů buněk byla popsána i maligní transformace v důsledku aktivity LT a ST (Major a Mayorca 1973; Portolani et al. 1975) nebo integrace do chromozomální DNA (Kenan et al. 2017, 2015). BKV je též popsán jako možný kofaktor vzniku rakoviny prostaty (Das et al. 2008; Delbue et al. 2013). Můžeme jej tak označit pro člověka za potenciálně onkogenní (Tognon et al. 2003).

2.1.5 Vliv polyomavirů na buněčnou signalizaci

U polyomavirů byla popsána interakce časných T proteinů s několika signalizačními komponentami zúčastněných v buněčném cyklu, DNA reparaci, apoptóze a imunitní odpovědi.

2.1.5.1 LT

LT polyomavirů se skládají z několika společných domén. Konkrétně DnaJ domény, linkeru, domény vázající počátek replikace, zinek-vázající domény a helikázové/ATPázové domény. LT tvoří hexamerní strukturu, která rozvíjí virovou DNA pro účely replikace (An et al. 2012; Topalis et al. 2013). Mimo to má i domény rozeznávající hostitelské proteiny, například p53 vazebné místo v helikázové/ATPázové doméně. LT protein BKV tvoří komplex s p53 a zadržuje jej v cytoplasmě, čímž se zvyšuje mutační profil infikované buňky a tím i riziko tumorogeneze (Liu et al. 2014).

Pravděpodobně nejdůležitějším interakčním partnerem LT téměř všech polyomavirů je rodina pRb (pRb, p107, p130). Protein pRb je esenciální v regulaci E2F transkripčních faktorů a zahájení buněčného cyklu, čímž napomáhá replikaci viru. Konzervovaný vazebný motiv pro pRb proteiny se nachází v oblasti linkeru. Při vazbě LT s pRb proteiny dochází k disociaci E2F transkripčního faktoru z komplexu s pRb a následnému spuštění buněčného cyklu. LT obsahuje ve své DnaJ doméně navíc CR1

motiv, který ještě více napomáhá disociaci E2F a stimulaci buněčné proliferace (An et al. 2012; Harris et al. 1996, 1998). U viru SV40 byla též popsána důležitá účast DnaJ domény na fosforylaci pRb proteinů, uvolňující tak E2F z komplexu. Předpokládá se, že energie potřebná na disociaci E2F je poskytnuta z vazby DnaJ domény s heat shock proteinem Hsc70 (Stubdal et al. 1997; Brown a Gallie 2002; Sullivan et al. 2000). E2F pak kromě aktivace buněčného cyklu spouští mimo jiné expresi DNA metyltransferázy 1. Ta může být zodpovědná za metylaci DNA v úseku kódujícím tumor supresorové geny a tím zablokovat jejich expresi a napomoci rozvoji karcinogeneze (McCabe et al. 2006). Záměrné rozrušení komplexu pRb s E2F vede k nekontrolovatelné proliferaci a je tak jednou z hlavních příčin tumorogeneze polyomavirů (Dalianis a Hirsch 2013).

Dalším proteinem schopným interakce s LT je β -katenin, důležitý regulační protein Wnt dráhy regulující diferenciaci, vývoj, polaritu a buněčný cyklus buněčným kontaktem. JCV LT stabilizuje β -katenin a zvyšuje jeho hladinu a lokalizaci v jádře, kde navozuje expresi proteinů c-myc a cyklinu D1, které spouští buněčný cyklus (Ripple et al. 2014).

Všechny polyomaviry, kromě MCV mají vazebnou doménu pro checkpoint kinázu Bub1, hrající roli v kontrolním bodě skládání a napojení dělicích vřetének na chromozomy. Interakce LT s Bub1 tak má za následek chromozomální nestabilitu podporující vznik tumorogeneze (Cotsiki et al. 2004; Hein et al. 2009).

2.1.5.2 ST

ST je další protein s tumorogenními vlastnostmi. Není nezbytný pro virovou replikaci, avšak jeho přítomnost stabilizuje LT a napomáhá efektivní virové replikaci. Skládá se ze dvou domén, DnaJ domény, která je stejně jako u LT schopna vázat buněčný chaperon Hsc70, a unikátní domény se dvěma zinc-binding doménami, které poskytují proteinu funkční a strukturní stabilitu (Khalil et al. 2008).

Hlavním interakčním partnerem ST je serin-threonin fosfatáza PP2A, pro kterou má ST dvě vazebné domény (Pallas et al. 1990). Vzhledem k jeho účasti v několika signálních drahách můžeme PP2A označit za tumor supresorový protein. Následná deregulace tak může nastat u p53, Akt, c-myc, cyklin dependentních kináz, inhibitoru cyklin dependentních kináz, β -kateninu nebo u MAP kinázové (MAPK) dráhy (Schuchner a Wintersberger 1999; Seshacharyulu et al. 2013; Wu et al. 2016). Většina těchto drah je regulována právě defosforylační aktivitou PP2A a její inhibice tak může

vést k významné deregulaci buněčného cyklu. Inhibiční vliv ST byl popsán i v prozánětlivé signalizaci, u které ST snižuje translokaci NF- κ B do jádra. Inhibice je zprostředkována interakcí ST s NF κ B esenciálním modulátorem (NEMO), kvůli níž nedochází k fosforylaci inhibitoru κ B (I κ B) přes komplex jeho kináz IKK α /IKK β (Abdul-Sada et al. 2017; Griffiths et al. 2013).

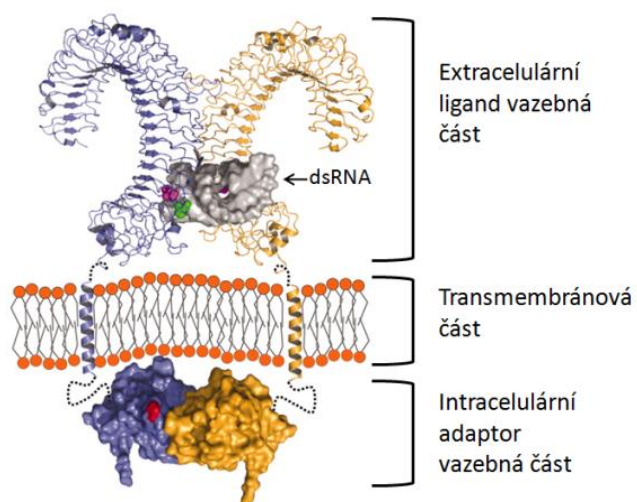
2.2 Molekulární složky antivirové vrozené imunity

První překážkou, kterou musí virus překonat před systémem vrozené imunity, jsou anatomické bariéry. Mezi tyto bariéry můžeme zařadit například kůži, bakteriální mikroflóru, pH, kontinuální omývání sliznic, zažívací enzymy nebo mukus. V mukusu již můžeme nalézt póry formující a viry agregující defensiny, které již lze považovat za imunitní molekuly (Daher et al. 1986; Wilson et al. 2013). Vrozená imunita v pravém slova smyslu je však aktivována po kontaktu viru s buňkou, kdy je virus rozpoznán extracelulárně povrchovými receptory, nebo intracelulárně cytoplazmatickými senzory nukleových kyselin.

2.2.1 Antivirové receptory vrozené imunity

Receptory molekulových vzorů (PRR) rozpoznávají složky patogenních membrán nebo jejich nukleové kyseliny (PAMP) a reprezentují první linii antivirové obrany v cílové infikované buňce. Receptory nukleových kyselin jsou doposud nejlépe popsány receptory antivirové obrany. Mezi tyto PRR patří membránové Toll-like receptory (TLR) a cytoplazmatické senzory, například NOD-like receptory nebo RIG-I-like receptory (RLR) (Takeuchi a Akira 2017).

TLR jsou typem membránových PRR schopných rozeznávat složky bakterií, plísní, kvasinek, parazitů a virů. U člověka bylo popsáno doposud 10 TLR, přičemž každý rozpoznává jiný typ PAMP. TLR obsahuje ve své extracelulární části leucinové repetice zodpovědné za detekci patogenních složek (Obrázek 4). Transmembránový helix poté spojuje tyto leucinové repetice s intracelulární částí receptoru, která následně interakcí s adaptorovými proteiny dále šíří signál a spouští expresi cytokinů (Botos et al. 2011). V antivirové obraně hrají roli zejména TLR3, 7 a 8, které rozpoznávají RNA a TLR9, který detekuje nemetylované CpG úseky na DNA.



Obrázek 4 Znázornění struktury TLR3 a jeho ligandu. Dimerní TLR3 s navázanou dsRNA přes leucinové repetice. TLR3 je ukotven v membráně přes α -helix, spojující extracelulární část a intracelulární část, která dále signalizuje interakci proteinů s homologní doménou (Bell et al. 2006 - Upraveno).

TLR schopné rozpoznat virus se však na membránách cílových buněk virů vyskytují v malé míře. Jakmile viry vstoupí do cytoplasmy, mohou být již velmi těžko detekovány TLR receptory. U infikovaných buněk hrají mnohem větší roli senzory nukleových kyselin přítomné v cytoplasmě. Detekce virových nukleových kyselin spouští dva typy signalizace, zprostředkované mitochondriálním proteinem IPS-1 nebo přes protein STING vázaný na ER. Dráha přes IPS-1 je aktivována antivirovým zástupcem NOD-like receptorů NOD2 a pravděpodobně nejznámějšími RLR senzory RIG-I, MDA5 a RNA polymerázou III, schopné detekce virové RNA vzniklé při transkripci a replikaci viru (Chiu et al. 2009; Feng et al. 2012; Hornung et al. 2006; Pichlmair et al. 2006; Sabbah et al. 2010). Senzory cGAS a IFI16 stimulují STING dráhu při detekci virové DNA, která se dostala do cytoplazmy z virionu po infekci nebo při replikaci viru (Ablasser et al. 2013; Diner et al. 2016; Sun et al. 2013). Detailnímu mechanismu antivirové signalizace se následně věnuje kapitola 2.4.1 a 2.4.2.

Výsledkem membránové a cytoplazmatické detekce viru je navození antivirového stavu infikované buňky a buněk v jejím okolí, což zabrání rozšíření infekce v tkáni. Toto navození antivirového stavu je důsledkem sekrece pravděpodobně nejdůležitějšího antivirového cytokinu – interferonu. Spolu s interferony dochází i částečně k produkci prozánětlivých cytokinů.

2.2.2 Interferony

Interferony jsou skupinou cytokinů produkovanou širokou škálou buněk jakožto odpověď na infekci viry, bakteriemi nebo parazity. Navozují antivirový stav buňky,

antigenní prezentaci, zastavují proliferaci a stimulují fagocyty a NK buňky. Díky těmto vlastnostem je používán i v léčbě některých virových infekcí nebo rakovinových a autoimunitních onemocnění (Conjeevaram et al. 2006; Khar et al. 2015; Kieffer et al. 2007; Medrano et al. 2017; Paolicelli et al. 2009; Rijckborst a Janssen 2010). Na základě jejich struktury, funkce a receptoru, se kterým interagují, je lze rozdělit na tři typy (Weerd a Nguyen 2012).

2.2.2.1 Typ I

Do skupiny prvního typu (IFN I) spadá celkem 5 monomerních druhů interferonu, IFN- α , IFN- β , IFN- ω , IFN- ϵ a IFN- κ (Pestka, Krause, and Walter 2004), které se společně váží na jediný receptor, a sice interferonový receptor α/β (IFNAR) (Novick et al. 1994). Pravděpodobně nejdůležitějšími dvěma druhy jsou IFN- α a IFN- β , přičemž IFN- α můžeme ještě dále rozdělit na 13 subtypů kódovaných separátními geny chromozomu 9 (Slate et al. 1982). Rozpozná-li buňka virovou infekci, dochází k fosforylaci a jaderné translokaci interferon response factor 3 (IRF3) a k produkci a sekreci IFN- β . IFN- β pak autokrinně i parakrinně navozuje expresi stovek interferonem stimulovaných genů (ISG), které se podílejí na restrikci virové infekce blokující replikaci viru a zvyšující expresi molekul MHC, které pak ve větší míře prezentují virové antigeny cytotoxickým i pomocným T-lymfocytům. Tím je zamezeno rozšíření viru do okolních buněk, likvidace buněk již infikovaných a indukce protilátkové odpovědi (Ivashkiv a Donlin 2014; McNab et al. 2015). Jedním z produktů ISG je i transkripční faktor IRF7, který vede k produkci endokrinního IFN- α . Produkce IFN- α/β jsou schopny všechny buňky, kromě erytrocytů, avšak v naprosto největší míře je produkují pDC (Siegal et al. 1999).

2.2.2.2 Typ II

Jediným zástupcem druhého typu je interferon gamma (IFN- γ). Jedná se o prozánětlivý strukturně odlišný homodimerní cytokin signalizující přes interferonový gamma receptor (IFNGR) (Bach et al. 1997). Je produkován hlavně aktivovanými NK buňkami a T lymfocyty (Chan et al. 1991; Scharon and Scott 1993). Má též antivirový účinek, avšak ne v tak velké míře jako IFN I. Jeho hlavním účinkem je aktivace a diferenciací imunitních buněk, zejména makrofágů (Adams 1989; Heise a Iv 1995) a T a B lymfocytů (Abed et al. 1994; Katona et al. 1988; Sercan et al. 2010). Posunuje směr

imunitní odpovědi k Th1 a naopak blokuje indukci Th2 odpovědi (Bradley et al. 1996; Fitch 1988).

2.2.2.3 Typ III

Interferony lambda (IFN- λ) jsou třetím popsaným typem interferonů, přičemž se vyskytuje ve čtyřech homologních subtypech. Jsou produkovány převážně epiteliálními buňkami a myeloidními dendritickými buňkami typu 2 (mDC2) spolu s IFN I a mají podobný antivirový účinek. Receptorem pro IFN III je heterodimer specifické podjednotky pro IFN III a z podjednotky specifické pro IL-10. Kromě antivirového účinku byl popsán i jejich protektivní vliv na udržení homeostázy na respiračních sliznicích a trávicím traktu. Jeho efekt je nejvíce cílen na epiteliální buňky (Andreaskos et al. 2017; Dvir et al. 2017; Hemann et al. 2017; Sommereyns et al. 2008; Syedbasha a Egli 2017).

2.2.3 Prozánětlivé cytokiny TNF- α a IL-6

Faktor nekrotizující nádory (TNF- α) a interleukin 6 (IL-6) jsou zástupci prozánětlivých cytokinů, které produkuje široká škála buněk. TNF- α je v menší míře produkován spolu s IFN I. Lze jej detekovat jako trimerní membránově vázaný nebo jako solubilní cytokin. Má širokou škálu účinku, indukuje zánět, navozuje apoptózu a brání rozvoji tumorogeneze. Vykazuje též antivirové účinky a u HIV byl popsán jeho stimulační účinek na virovou replikaci (Mestan et al. 1986; Osborn et al. 1989; Seo a Webster 2002). IL-6 je vysoce pleiotropní cytokin a myokinin s širokou škálou účinku především v oblasti zánětu. Je produkován v místech infekce nebo poškození tkáně, přičemž dále přechází do jater, kde indukuje produkci proteinů zúčastněných v akutní fázi zánětu. Vykazuje i antivirové účinky a je růstovým faktorem (Takahashi et al. 2010).

2.2.4 Interferonem stimulované geny

Poté co je virus rozpoznán PRR, dochází k aktivaci signální kaskády vedoucí k produkci IFN, který zpětně v buňce vyvolává transkripci stovek ISG. Zatímco IFN I a IFN III indukují identické spektrum ISG nesoucích na promotoru elementy interferonem stimulované odpovědi (ISRE), IFN II indukuje překrývající se, ale částečně specifické spektrum ISG nesoucích na promotoru motiv interferonem gamma aktivované sekvence (GAS). (Der et al. 1998). Produkty těchto genů poté vykazují různorodé antivirové účinky, které jsou schopny cílit téměř každý krok životního cyklu viru. Cílem je i buňka

samotná, kde blokují například buněčný cyklus a tím i replikaci viru. Mezi tyto ISG lze zařadit i některé PRR nebo cytokiny, jejichž exprese je zvýšena (Der et al. 1998).

2.2.5 BK virus a interferon

Pouze velmi málo dosavadních studií je věnováno roli BKV ve vrozené imunitě. Bylo popsáno, že u epiteliálních buněk lidských sběrných ledvinových kanálků po expozici BKV byla naměřena zvýšená exprese TLR3, IL-8 a IL-6. Zvýšená exprese TLR3 byla popsána i u biopsií s PVAN (Ribeiro et al. 2012). U modelu PVAN byl naměřen pokles produkce TNF- α a naopak nárůst exprese receptoru pro TNF- α , což může ještě více přispět k rozvoji PVAN (Ribeiro et al. 2016). Bylo též popsáno, že exprese BKV LT v myších embryonálních fibroblastech vede k aktivaci ISG (Giacobbi et al. 2015). Studie na ledvinových epiteliálních buňkách proximálních tubulů (HRPTEC) infikovaných BKV, což jsou buňky, ve kterých BKV perzistuje, však zatím neprokázaly aktivaci vrozené imunitní odpovědi. V buňkách HRPTEC BKV spouští cytokinovou odpověď avšak bez aktivace ISG, zodpovědných za antivirovou imunitní odpověď (Abend et al. 2010; Assetta et al. 2016).

Po infekci buněk HRPTEC viry JCV a BKV lze detekovat produkci IFN- β . BKV infikované buňky však oproti JCV infikovaným buňkám postrádají schopnost aktivace vrozené antivirové odpovědi. V porovnání s JCV nebyla u BKV naměřena vysoká aktivace ISG. Pouze 4 ISG (*IFI6*, *IRF7*, *OAS3* a *HERC5*) lze detekovat 6 dní po infekci (dpi) a pouze jeden ISG 9 dpi (*HERC5*). Spolu s produkcí IFN- β byla naměřena i zvýšená produkce supresoru cytokinové signalizace 3 (SOCS3) 6-9 dpi, který je schopen zablokovat cytokinovou produkci a také indukci ISG. SOCS3 tak může být i příčinou, poklesu ISG, konkrétně hladiny IRF7. Exprese SOCS3 však může být zvýšena i JAK/STAT dráhou v reakci na produkci IFN- β tvořící tak negativní zpětnou vazbu. Nelze tak s jistotou říci, že BKV přímo zvyšuje expresi SOCS3 a blokuje tak antivirovou odpověď, jelikož SOCS3 může být také aktivovaný vazbou IFN I na IFNAR a aktivací JAK/STAT dráhy (kapitola 2.4.3). Zvýšená exprese těchto supresorů však nebyla naměřena u JCV infekce (Assetta et al. 2016).

Vzhledem k faktu, že BKV postihuje epiteliální buňky a receptor pro IFN- λ se v močovém epitelu nachází ve velkém množství, byl zkoumán i vztah IFN- λ a PVAN. Studie Dvir et al. 2017 byla zaměřena na efekt jednonukleotidového polymorfismu rs1279860 u IFN- λ na BKV, který byl již dříve studován u viru hepatitidy C (HCV) ve

vztahu úspěšnosti léčby (Ge et al. 2009). U pacientů, u nichž byla detekována vysoká viremie a virurie BKV po transplantaci ledvin, se nevrozvinula PVAN v případě, že tento polymorfismus IFN- λ nevykazovali (Dvir et al. 2017). IFN- λ tak zřejmě hraje velmi důležitou roli v kontrole BKV a s ním spojené patogenezi.

2.3 Buněčné složky antivirové vrozené imunity

Receptory reprezentující první linii obrany jsou přítomny i na buňkách zastávajících roli druhé linie obrany ve vrozené imunitě. Mezi tyto buňky můžeme zařadit fagocytující makrofágy, NK buňky detekující infikované buňky a antigen prezentující nebo IFN produkující dendritické buňky. Vzhledem k tématu této práce se dále zaměřím pouze na popis dendritických buněk (DC), jejichž funkce je spojena s vysokou produkcí IFN I.

2.3.1 Plasmacytoidní dendritické buňky

V oblasti vrozené imunity jsou pDC velmi důležitými hráči, zejména z důvodu vysoké produkce IFN I, díky čemuž účinně bojují proti virové infekci. Mimo jejich schopnosti produkce IFN I jsou též schopny účinné antigenní prezentace. (Swiecki a Colonna 2015).

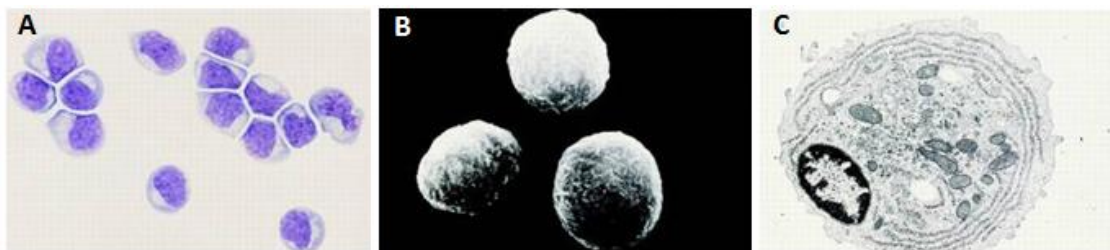
2.3.1.1 Vývoj, fenotyp a lokalizace

Vývoj pDC probíhá v kostní dřeni z hematopoetických buněk diferencujících ve společný prekursor pro dvě buněčné linie, monocyty a DC. Následný společný prekursor pro DC pak vede ke vzniku mDC a pDC (Tsunetsugu-Yokota a Muhsen 2013). Porovnáme-li však fenotypově mDC s pDC narazíme u pDC na odlišné receptorové i proteinové zastoupení buňky, což jim umožňuje rychlou produkci IFN I. Specifickým markerem pro pDC je blood dendritic cell antigen 2 (BDCA-2). Navzdory tomu, že vznikly ze stejného prekursoru, postrádají marker dendritických buněk a makrofágů DC-SIGN. Povrchově lze pDC charakterizovat jako Lin⁻; MHC-II⁺; CD4⁺; IL3R⁺; BDCA-2⁺ a BDCA4⁺ (Mathan et al. 2013). Jako jedny z mála buněk exprimují velmi vysoké množství endosomálních TLR7 a 9. Na povrchu pDC se také nachází i široké množství chemokinových receptorů, které tak propůjčují buňce vysoký migrační potenciál. V krevním oběhu tvoří přibližně 0,4% z periferních mononukleárních krevních buněk (PBMC). Dále je můžeme nalézt v thymu, kostní dřeni, lymfatických uzlinách a lokálně v tkáni, například v játrech či slezině (Kingham et al. 2007; Zhou et al. 2016; Evans et al.

2011; Facchetti et al. 1988). Jejich akumulace byla zaznamenána v místech virové či bakteriální infekce a v nádorovém prostředí, kde jsou schopny spustit zánětlivou odpověď a sekrecí chemokinů atrahovat do míst další imunitní buňky. Stejně jako mDC jsou schopny i migrace do lymfatických uzlin a prezentace antigenu (Mckenna et al. 2005).

2.3.1.2 Produkce cytokinů

Morfologicky se pDC jeví jako plazmatické buňky s acentrickým jádrem a zvětšenou cytoplasmou (Obrázek 5A,C). Velikostně se pDC pohybují kolem 8-10 μm v průměru a mají hladký a kulatý tvar (Obrázek 5B). Elektron mikroskopický snímek (Obrázek 5C) ukazuje mohutně vyvinuté ER, které umožňuje plnit jejich hlavní funkci, a sice rychlou a vysokou produkci IFN I (Grouard et al. 1997).



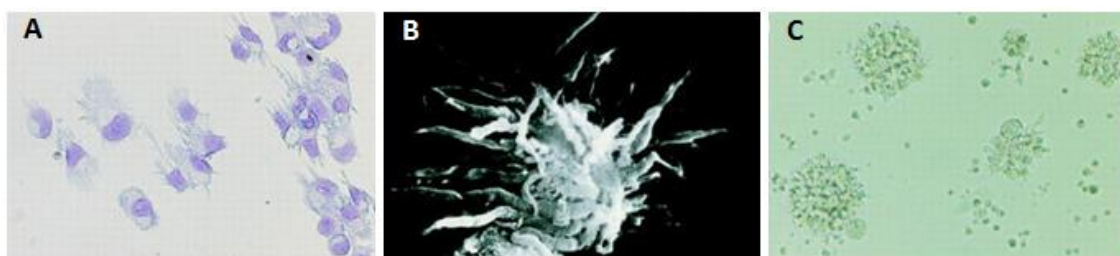
Obrázek 5 Morfologie pDC. (A) Geimsovo barvení pDC pod světelným mikroskopem. Tmavě zbarvené jádro a světle zbarvená cytoplazma. (B) Tvar pDC pod skenovacím elektronovým mikroskopem. (C) Transmisní elektronová mikroskopie řezu buňkou (Grouard et al. 1997 - Upraveno).

K tomu, aby pDC produkovaly daný cytokin, je buňka vybavena řadou PRR rozpoznávající PAMP. Tyto PRR jsou schopné rozpoznat viry, bakterie i nemetylované CpG DNA sekvence. Rozpoznají-li nějaký cizorodý motiv, spustí se signalizační kaskáda vedoucí k produkci prozánětlivých cytokinů typu TNF- α , IL-6, IL-1 a hlavně masivního množství IFN I. Rychlá a robustní produkce IFN I je zajištěna vysokou konstitutivní expresí klíčových transkripčních faktorů zúčastněných v signalizační dráze a též vysoké schopností detekce viru v endosomálních kompartmentech oproti jiným buněčným typům. Díky tomu pDC produkují až 1000x více IFN I než ostatní buňky. Touto vlastností jsou tak schopny rychle zabránit rozšíření viru, což je činí klíčovými hráči v boji s viry v počátečních fázích infekce (Honda et al. 2005; Mckenna et al. 2005).

2.3.1.3 Antigenní prezentace

Většina buněk je uzpůsobena pouze jedné efektorové funkci, ve které zůstávají a vykonávají ji po většinu své existence. Vyjimkou jsou pDC, jejichž prvotní efektorové

stádium je uzpůsobeno vysoké produkci IFN I. Z tohoto stádia však mohou dále diferencovat do funkce profesionálních antigen prezentujících buněk (APC). Tato maturace pDC však vede ke ztrátě schopnosti produkce vysokého množství IFN I. Jsou tak unikátním typem buněk, které přechází z jedné efektorové funkce ve vrozené imunitě do funkce druhé, která spojuje imunitu vrozenou s imunitou adaptivní (Mckenna et al. 2005). Přesný mechanismus, který tuto maturaci spouští nebyl doposud zcela jasně objasněn. Stimulace TLR virovými či bakteriálními komponentami má za následek jak produkci IFN I, tak diferenciaci v APC. Závisí tak pravděpodobně na typu a kvalitě signálu. Signálem může být IL-3, který je účinným induktorem diferenciaci v APC. Zajisté však v diferenciaci hrají roli další doposud nepopsané faktory. Tato maturace s sebou nese ztrátu morfologie plasmacytoidní hladké a kulaté buňky a její změnu na typický paprskovitý tvar běžný pro mDC (Obrázek 6A,B). Dochází k obměně povrchových receptorů, vysoké expresi MHC molekul a kostimulačních molekul pro CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocyty. Zvětšuje se i plocha, kterou pDC díky svým dendritům zaujímají. Zároveň jsou schopny tvorby shluků (Obrázek 6C) a stimulace většího počtu T-lymfocytů (Soumelis a Liu 2006).



Obrázek 6 Změna morfologie pDC na APC. (A) Geimsovo barvení pDC (APC) pod světelným mikroskopem. Tmavě zbarvené jádro a světlá zvětšená paprskovitá cytoplazma. (B) Tvar pDC (APC) pod skenovacím elektronovým mikroskopem. (C) Světelná mikroskopie zformovaných shluků pDC (APC) (Grouard et al. 1997 - Upraveno).

Schopnost diferenciaci v APC tak ještě zvyšuje její důležitou antivirovou funkci, jelikož pro potlačení virové infekce a likvidaci infikovaných buněk je mimo jiné potřeba aktivovat i cytotoxické CD8⁺ T lymfocyty. Aby však mohly být aktivovány, je třeba prezentovat exogenní virové antigeny na MHC I, které primárně slouží k prezentaci intracelulárních proteinů. Pro tento případ využívají pDC schopnosti zkřížené prezentace, při které je buňka schopna dopravit a prezentovat pohlčené exogenní antigeny nikoli v komplexu s MHC II, ale v komplexu s MHC I. Díky tomu je schopna rychle aktivovat CD8⁺ T lymfocyty a zabránit tak rychlému rozšíření viru likvidací infikovaných buněk.

Nebýt zkřížené prezentace, virové antigeny by nemohly být prezentovány na MHC I, vzhledem k faktu, že pDC jsou pro většinu virů nepermissivní (Tel et al. 2012).

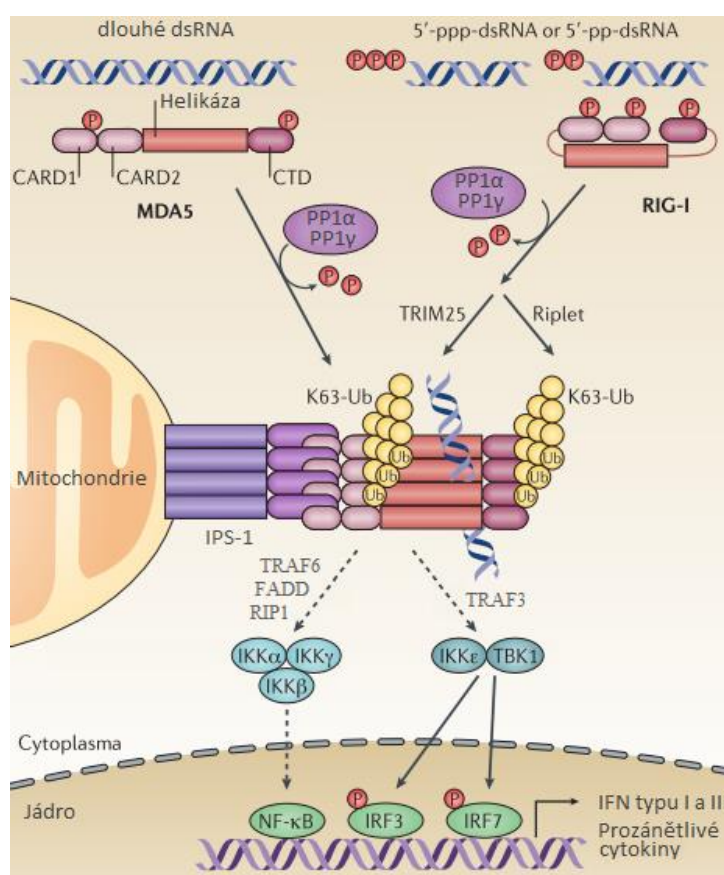
2.4 Interakce viru s plasmacytoidní dendritickou buňkou

Existuje několik mechanismů, jakými pDC rozpoznají virovou infekci. Virus může být rozpoznán extracelulárně povrchovými PRR, nebo intracelulárně cytosolickými senzory. Jejich aktivací se spustí rychlá produkce IFN I, maturace pDC s obměnou povrchových receptorů a sekrece dalších cytokinů a chemokinů. Některé viry naopak nemusí být vůbec rozpoznány, nebo dokáží v pDC velmi účinně zablokovat produkci IFN I. Vzhledem k tomu, že pDC jsou pro většinu virů nepermissivní, je zde i možnost nepřímé detekce viru zprostředkované kontaktem s infikovanou buňkou. Interakce viru nebo virem infikované buňky s pDC tak může vyústit k produkci IFN I a navození antivirového stavu, nebo k inhibici produkce IFN I a progresi virové infekce (Colonna et al. 2004). Spolu s produkcí IFN I exprimují pDC na svém povrchu po aktivaci TLR ligand pro TNF-asociovaný receptor (TRAIL), kterým spouští apoptózu infikovaných buněk (Brincks et al. 2008; Chaperot et al. 2006; Gandini et al. 2013; Hardy et al. 2007). Po aktivaci se tak mohou pDC chovat i jako efektorové buňky, které likvidují virem infikované buňky.

2.4.1 Aktivace cytoplasmatických senzorů v pDC

Cytoplasmatické senzory hrají u pDC roli poté, co je virus schopen pDC infikovat a replikovat se v ní, jako je tomu v případě viru žluté zimnice, Sendai viru nebo respiračního syncytiálního viru (Bruni et al. 2015; Hornung et al. 2004). Dochází poté k aktivaci senzoru RIG-I, který je zástupcem RLR spolu s dvěma dalšími popsány členy, MDA5 a LGP2 (Kang et al. 2002; Yoneyama et al. 2004). RIG-I je angažován hlavně v detekci kratších ss/dsRNA s 5'ppp nebo 5'pp a MDA5 naopak rozpoznává dlouhé dsRNA. Jejich angažovanost a odpověď na různé viry se tudíž liší v závislosti na velikosti a typu RNA (Kato et al. 2006; Kawai a Akira 2007). RIG-I a MDA5 obsahují dvě CARD domény, které jsou za normálních podmínek fyzicky blokovány C-terminální doménou, a RNA helikázovou doménou, která je zodpovědná za vazbu RNA. Po detekci RNA dochází k rozvolnění proteinu a expozici CARD domény, která spouští signální kaskádu (Saito et al. 2007). LGP2 tuto CARD doménu neobsahuje a jeho role je doposud kontroverzní, jelikož se studie rozcházejí v jeho negativní a pozitivní regulaci RLR (Komuro a Horvath 2006; Rothenfusser et al. 2005; Satoh et al. 2010; Venkataraman et

al. 2007). RIG-I a MDA5 s navázanými RNA jsou defosforylovány a polyubiquitinylovány. Následně svojí CARD doménou interagují se společným adaptorovým proteinem IPS-1 (též MAVS/Cardiff/VISA), čímž spouští dvojí typ signalizace (Obrázek 7) (Kawai et al. 2005). Interferonová signalizace je spuštěna přemostěním IPS-1 s komplexem TBK1/IKKε pomocí linkeru TRAF3 (Saha et al. 2006). TBK1/IKKε poté fosforylují IRF7 a 3 a spouští tak transkripci IFN I a III (Paz et al. 2006). Druhá větev RLR signalizace je zprostředkována interakcí IPS-1 s FADD, TRAF6 nebo RIP1, které dále aktivují komplex IKKα/β/μ. Ten následně spouští NFκB dráhu důležitou jak pro produkci prozánětlivých cytokinů, tak pro indukci produkce IFN I a III (Obrázek 7) (Balachandran et al. 2004; Takahashi et al. 2006).



Obrázek 7 Signální kaskáda RIG-I/MDA5 aktivovaná detekcí virových RNA v buňce. Po detekci RNA dochází k defosforylaci a polyubiquitinylaci RLR pomocí TRIM25 a Riplet ubiquitin ligázy. Poté dochází k vazbě RLR na IPS-1 a přes vazbu adaptorů k aktivaci různých IKK kináz. V závislosti na typu stimulu dochází k signalizaci přes NFκB a IRF3/7 dráhu vedoucí k produkci prozánětlivých cytokinů a IFN I a III (Chan a Gack 2016 - Upraveno).

Zatímco knockout cytoplasmatických virových RNA senzorů u mDC, makrofágů nebo fibroblastů má za následek defekty v produkci IFN I, pDC jsou stále schopny jeho

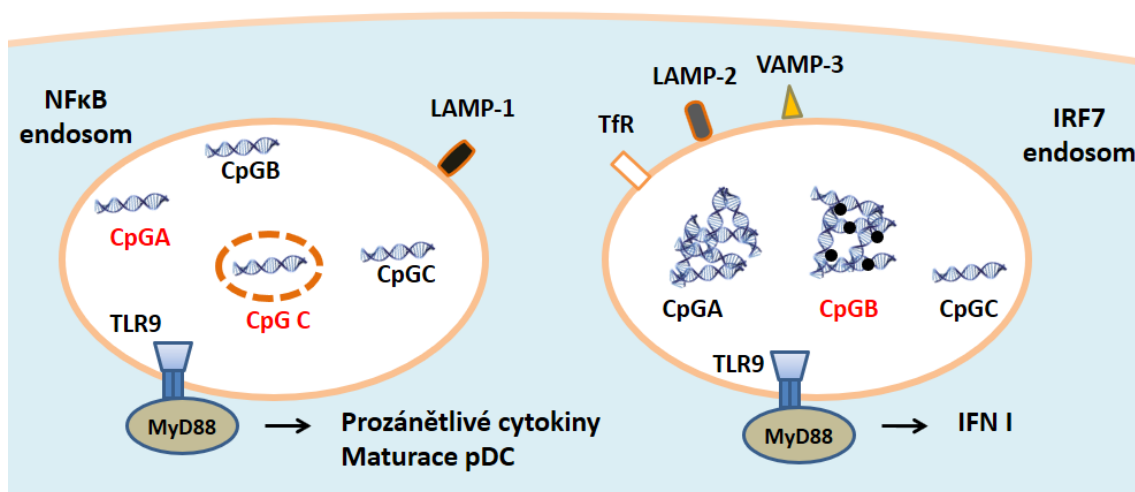
produkce (Kato et al. 2005). Popsaným mechanismem, kterým pDC obchází cytoplasmatickou detekci nukleových kyselin, je schopnost autofágie virových RNA. Autofagosom poté splyne s endosomem a RNA je následně rozpoznána pomocí TLR7 nebo TLR3 (Lee et al. 2007). To napovídá spíše o esenciální roli endosomálních TLR receptorů a minoritní roli cytoplazmatických senzorů u pDC, vzhledem k nepermissivnosti pDC pro většinu virů.

2.4.2 Aktivace TLR7/9 v NFκB a IRF7 endosomu pDC

Jedním z důvodů proč jsou pDC schopny tak rychlé a masivní produkce IFN I je konstitutivní a vysoká exprese IRF7 (Honda et al. 2005; Izaguirre et al. 2003). Chybné by však bylo považovat expresi IRF7 za jediný faktor určující vysokou produkci IFN I. U pDC hrají důležitou roli endosomální kompartmenty, ve kterých exprimují oproti jiným buňkám ve velmi vysoké množství TLR7 a 9. Endosomální kompartmenty pDC vykazují velké odlišnosti v jejich schopnosti spustit produkci cytokinů v reakci na virovou DNA/RNA. U pDC můžeme definovat dva typy endosomů, IFN I signalizující IRF7 endosom a prozánětlivý NFκB endosom. Pro masivní produkci IFN I je u pDC tedy kromě vysoké hladiny IRF7 i stěžejní role IRF7 endosomu, do kterého je virus dopraven pomocí adaptorové molekuly AP3 (Sasai, Linehan, and Iwasaki 2010). Zde pDC využijí i své schopnosti pozdržet komplex ligand-TLR7/9-MyD88 po delší dobu ve stavu aktivace, čímž spolu s vysokou hladinou IRF7 dokáže po delší dobu signalizovat z IRF7 endosomu, aniž by došlo k nedostatku signalizačních komponent (Honda et al. 2005). Dalším klíčovým bodem je doprava TLR9 z ER do endosomu, kde pro zdárnou detekci DNA musí dojít prvně k jeho aktivaci proteolytickým naštepením (Kim et al. 2008; Park et al. 2009). To, zdali dojde pouze k produkci IFN I, závisí na proteinu BAD-LAMP, který je zodpovědný za transport TLR9 ze signalizujícího IRF7 endosomu do NFκB endosomu s následnou indukcí produkce prozánětlivých cytokinů. Inhibice exprese proteinu BAD-LAMP tak vede pouze k produkci IFN I a nikoli prozánětlivých cytokinů, jelikož TLR9 nemůže být dopraven do NFκB endosomu a zůstává v IRF7 endosomu (Combes et al. 2017).

Pokusy se třemi syntetickými ligandy TLR9, DNA oligonukleotidy CpGA, CpGB a CpGC, potvrdily různé zapojení endosomů ve výsledné signalizaci. CpGA, jakožto první typ, vytváří multimerní nanočástice, které velmi dobře stimulují TLR9 v pDC k vysoké produkci IFN I z IRF7 endosomu (Kerkmann et al. 2005). Naopak druhý typ,

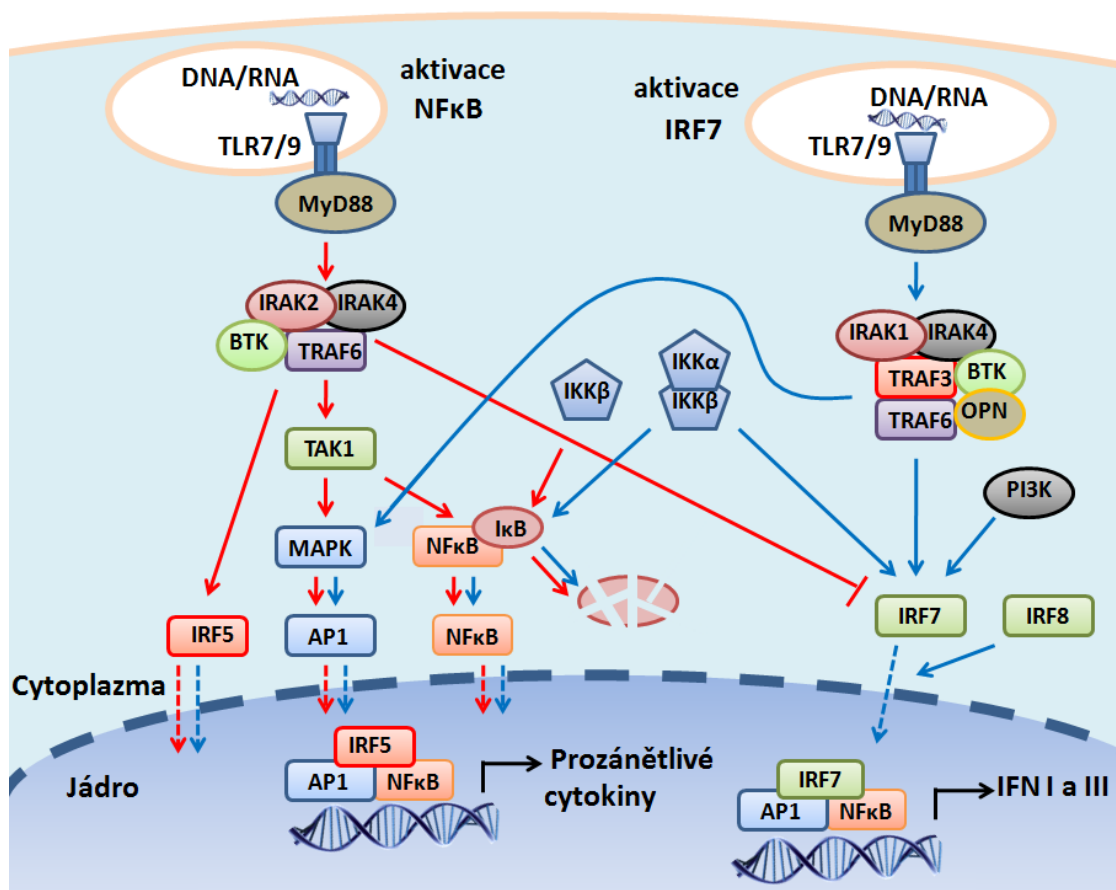
monomerní CpGB, stimuluje pDC spíše k produkci prozánětlivých cytokinů a maturaci pDC. Vytvoříme-li však experimentálně monomerní CpGA a nanočástici z multimerního CpGB, zjistíme, že jejich stimulační potenciál je opačný. Třetím typem je CpGC, který je schopen stimulace v obou typech endosomů, avšak jeho zabalení do liposomu, indukuje pouze stimulaci z NFκB endosomu (Obrázek 8) (Guiducci et al. 2006). Se znalostmi na endosomu závislé produkce IFN I tak můžeme u mDC navodit srovnatelnou produkci IFN I jako u pDC. Jedinou podmínkou je pozdržet TLR9 ligand déle v IRF7 endosomu, který je u mDC za normálních podmínek rychle převeden do NFκB endosomu s následnou produkcí prozánětlivých cytokinů. Obecně tak lze konstatovat, že nezáleží na valenci ligandu, ale na jeho struktuře, od které se odvíjí jeho lokalizace a následná signalizace (Kim et al. 2014; Honda et al. 2005a).



Obrázek 8 Odlišná schopnost stimulace TLR9 syntetickými ligandy z NFκB a IRF7 endosomu. Červeně značené CpG jsou experimentálně připravené oligonukleotidy s opačnou strukturou. Černě značené CpG mají svou přirozenou strukturu. Markerem NFκB endosomu je s lysosomem-asociováný membránový protein 1 (LAMP-1). Markerem IRF7 endosomu je transferrinový receptor (TfR), LAMP-2 a s vesikly asociovaný membránový protein 3 (VAMP-3).

Endosomální prostředí způsobí rozvolnění kapsidy a vypuštění virové nukleové kyseliny, která je poté v případě ssRNA rozpoznána TLR7 a v případě dsDNA TLR9 (Kawai a Akira 2007). Aktivace těchto TLR způsobí nasednutí adaptorového proteinu MyD88 na intracelulární TIR doménu TLR (Obrázek 9). MyD88 dále přenáší signál přes kinázy IRAK1, IRAK4, TRAF6 a TRAF3, které fosforylují klíčový regulační faktor TLR signalizace vedoucí k produkci IFN I, a sice IRF7 (Honda et al. 2004; Hoshino et al. 2006; Kawai et al. 2004; Uematsu et al. 2005). Za další esenciální fosforylace IRF7 jsou

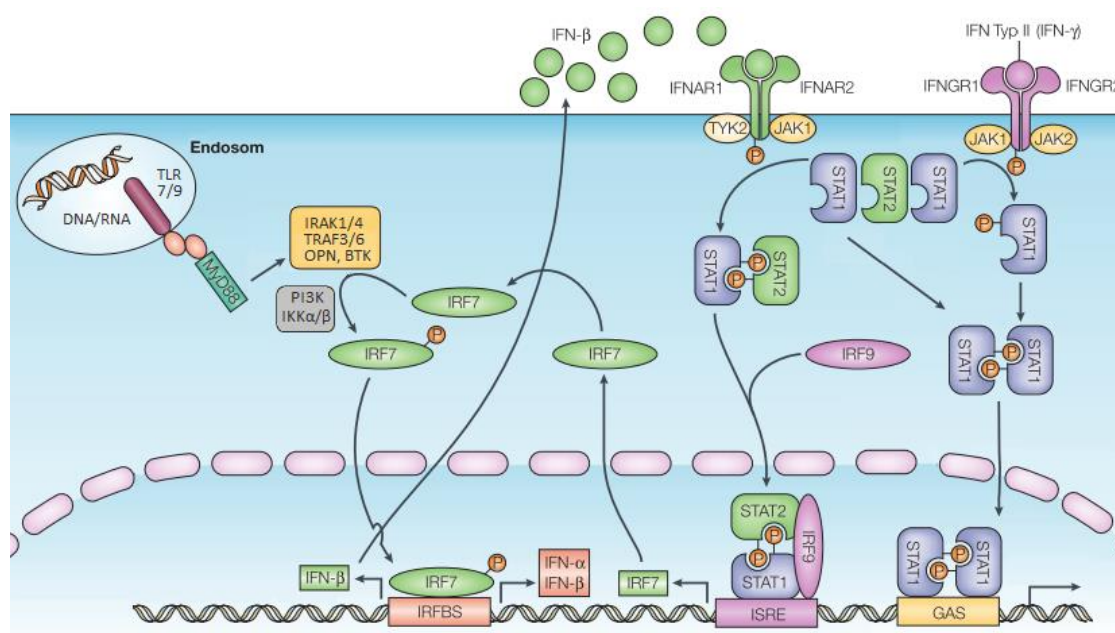
zodpovědné například $IKK\alpha/\beta$, OPN, BTK a PI3K (Guiducci et al. 2008; Miyamoto et al. 2010; Osawa et al. 2006; Shinohara et al. 2006). Dochází též k aktivaci NF κ B a MAPK, jejichž transkripční faktory NF κ B a AP1 kooperují s IRF7 v aktivaci promotoru pro IFN I (Gough et al. 2012; Honda a Taniguchi 2006). Již po 6 hodinách je tak 60% transkriptomu pDC určeno k expresi genů pro IFN I a III (Ito et al. 2006; Yin et al. 2012). Spolu s IFN I dochází také k aktivaci NF κ B dráhy signalizující produkci prozánětlivých cytokinů skrze aktivaci IRF5, MAPK a NF κ B (Obrázek 9) (Guiducci et al. 2006; Honda et al. 2005; Osawa et al. 2006; Steinhagen et al. 2013). Rovnováha mezi produkcí IFN I a prozánětlivých cytokinů je dána strukturou ligandu a odlišnostmi endosomálních kompartmentů, do kterých je tento ligand dopraven (Combes et al. 2017; Guiducci et al. 2006; Honda et al. 2005; Sasai et al. 2010).



Obrázek 9 TLR7/9 signální odlišnosti v aktivaci NF κ B a IRF7 dráhy. Aktivace TLR7/9 NF κ B vede především k produkci prozánětlivých cytokinů přes IRF5, AP1 a NF κ B transkripční faktory. Obdobná signalizace spouští produkci IFN I a III aktivací IRF7 spolu s transkripčními faktory AP1 a NF κ B.

2.4.3 Pozitivní zpětná vazba a JAK/STAT dráha

Pozitivní regulace IFN I se odehrává na základě stimulace buněk přes dimerní IFNAR, skládající se z podjednotky IFNAR1 a IFNAR2, který poté spouští tzv. kanonickou JAK/STAT dráhu. Tyto podjednotky asociují s kinázami JAK1 a TYK2, které následně fosforylují monomerní signální transduktory a aktivátory transkripce STAT1 a STAT2. Fosforylace způsobí vzájemnou dimerizaci STAT1 se STAT2 a tím navázání IRF9 na komplex STAT1/STAT2. Tento komplex nadále translokuje do jádra, kde se váže na ISRE sekvenci DNA a spouští transkripci ISG pro navození antivirového stavu (Obrázek 10). Stejnou dráhu využívá i IFN III. IFN II spouští přes svůj receptor IFNGR pouze fosforylaci STAT1. STAT1 poté vytváří homodimer, který také translokuje do jádra a nasednutím na GAS spouští transkripci antimikrobiálních genů. Touto rychlou signalizací přes STAT proteiny dochází k aktivaci imunitních buněk a produkci IFN- α , což má za následek zabránění rozšíření patogenu do okolí (Hervas-Stubbs et al. 2011).



Obrázek 10 Schéma pozitivní zpětné vazby IFN- β v produkci IFN- α . Endosomální aktivace TLR 7 a 9 vede k fosforylaci IRF7 a produkci IFN- β . Sekretovaný IFN- β spouští JAK/STAT signalizaci přes IFNAR. Vzniká heterodimer fosforylovaného STAT1 a STAT2 a tvoří komplex s IRF9. Komplex následně nasedá na ISRE element. Dochází k produkci IRF7 a IFN I. Mimo to dochází také k tvorbě homodimeru fosforylovaného STAT1, který nasedá na GAS a spouští tak produkci určitého množství antimikrobiálních látek. IRFBS – IRF vazebné místo (Decker et al. 2005 - Upraveno).

Přesný mechanismus produkce IFN- α , jeho kinetika, postupná indukce a pozitivní zpětná vazba nebyla doposud u pDC zcela dobře popsána. Nicméně studie na pDC buněčné linii Gen2.2 ukázala, že TLR7 indukovaná produkce IFN- β předchází produkci IFN- α . Transkripce *IFN β* mRNA je transientní, dosahující maxima po 2 hodinách a postupně se navracující do bazální hladiny během 5 hodin. Je též závislá na délce, kvalitě stimulu a následné aktivaci IKK β . IFN- β se poté váže na IFNAR a spouští fosforylaci STAT1/2 a tím produkci i IFN- α . Produkce IFN- α je tak závislá na pozitivní zpětné vazbě IFN- β aktivující JAK/STAT signalizaci (Obrázek 10). Transfekční pokusy též poukázaly, že IRF7 interaguje s promotorem pro *IFN β* a aktivita IRF7 je zvýšena po kotransfekci IKK β . IRF7 a IKK β jsou tak schopny potencionálního spolupůsobení při transkripci *IFN β* (Pauls et al. 2012). Další studie ukázala produkci ve dvou vlnách a závislost druhé vlny produkce IFN- α na IRF8 u mDC (Tailor et al. 2007). Samotná přítomnost lymfotropního choringomeningitis viru (LCMV) také není dostačující pro indukci IFN- α u IFNAR deficientních myších pDC a potvrzuje tak důležitost autokrinní stimulace pro následnou produkci IFN- α (Malmgaard et al. 2002).

2.4.4 Inhibice interferonové dráhy

Kromě receptorů aktivujících signalizační kaskády vedoucí k produkci IFN I obsahuje pDC i receptory, které produkci IFN I regulují. Mají roli v utlumení imunitní odpovědi, aby nedošlo k poškození tkáně z nadměrné produkce IFN I. Mimo jiné se uplatňují i při zachycení antigenů a jejich prezentaci. Mezi takovéto receptory patří lektinový receptor BDCA-2, Fc receptor, CD300a/c, DCIR nebo ILT7 (Cao et al. 2006, 2009, 2007; Dzionek et al. 2001; Ju et al. 2016; Meyer-wentrup et al. 2016). Při aktivaci TLR7/9 signalizace dochází k snížení exprese těchto regulačních receptorů a jejich internalizaci z povrchu membrány (Ju et al. 2016; Wu et al. 2008). Exprese některých regulačních receptorů je naopak indukována aktivací TLR7/9 (Blasius et al. 2006; Cao et al. 2009). Zpětnou regulaci IFN I si osvojili i některé viry, které skrze regulační receptory pDC blokují produkci IFN I, navozují toleranci a vytváří si optimální prostředí pro svou replikaci. Příkladem může být virus HCV, který interakcí jeho E2 glykoproteinu s BDCA-2 a DCIR inhibuje produkci IFN I (Florentin et al. 2016). V infikovaných buňkách HCV též blokuje cytoplasmatické PRR štěpením mitochondriálního IPS-1 (Li et al. 2005). Další inhibice IFN I přes BDCA-2 byla popsána u hepatitidy B (HBV) přes povrchový antigen (Xu et al. 2009) a u HIV pomocí povrchového glykoproteinu gp120

(Martinelli et al. 2007). Mnoho dalších virů si vytvořilo strategie, které blokují signalizaci přes TLR7/9 regulací jejich signalizačních komponent nebo přímo inhibicí exprese TLR (Fathallah et al. 2010; Hasan et al. 2007; Kitagawa et al. 2017; Pfaller a Conzelmann 2008; Schlender et al. 2005; Shahzad et al. 2013; Vincent et al. 2011; Yamaguchi et al. 2014).

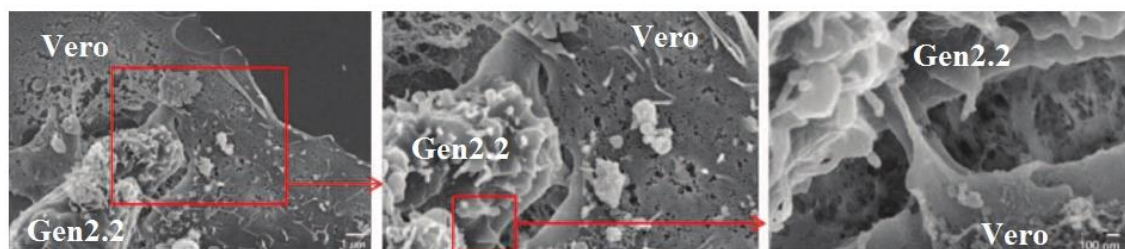
Nejen viry, ale i samotný IFN I má v dlouhodobém měřítku inhibiční efekt na pDC. Jeho působením dochází později k zvýšení exprese SOCS proteinů a proapoptotických molekul v pDC, což může být možným vysvětlením, proč je u chronických onemocnění typu HBV, HCV a HIV popsán pokles počtu pDC (Assetta et al. 2016; Finke et al. 2004; Goutagny et al. 2004; Swiecki et al. 2011). Kromě regulačních receptorů je tak IFN I sám sobě negativním regulátorem, čímž brání své nadměrné produkci a tím i možnému poškození tkáně.

2.4.5 Buněčný kontakt

Buněčný kontakt je těsná interakce mezi dvěma buňkami, klíčová pro zprostředkování mezibuněčné komunikace a přenosu signálů. Tento kontakt může být stabilním spojením buněk přes těsné spoje, které jsou zároveň podmínkou pro přežití buněk a tvorbu organizované tkáně. Zároveň díky nim mohou buňky reagovat koordinovaně (Anderson a Van Itallie 2009). Buněčný kontakt, který využívají imunitní buňky, je mediován spíše interakcí mezi receptory, případně je obdobou nervové synapse. Tato interakce je naopak důležitá pro aktivaci, maturaci a diferenciaci buněk, nebo pro spuštění signalizačních kaskád vedoucích k imunologicky tiché smrti dané buňky, která jeví znaky infekce, deregulace či nádorové transformace.

Ukazuje se, že v případě pDC hraje buněčný kontakt s infikovanou buňkou stejně důležitou roli jako detekce samotných virových partikulí. Některé případy virů mají dokonce vyšší schopnost stimulace pDC přes infikované buňky, než stimulace samotnými virovými částicemi (Bruni et al. 2015; Florentin et al. 2016; Lepelley et al. 2011). Při kokultivaci pDC buněčné linie Gen2.2 s buňkami Vero infikovanými virem žluté zimnice byla popsána tvorba filamentárních cytoplasmatických můstků spojujících cytoplasmu obou buněk (Obrázek 11) (Bruni et al. 2015). Díky těmto můstkům může přejít virus nebo virová RNA do pDC a spustit zde IFN I odpověď prostřednictvím RLR,

kteřá může být v infikovaných buňkách jinak zablokována (Bangham 2003; Hübner et al. 2009; Jin et al. 2009; Sherer et al. 2009).



Obrázek 11 Elektronová mikroskopie znázorňující kontakt buněk Vero infikovaných virem žluté zimnice s pDC buněčnou linií Gen2.2 a formování filamentárních můstků mezi buňkami (Bruni et al. 2015 - Upraveno).

Zajímavostí u viru žluté zimnice je fakt, že přímá interakce viru s pDC nespouští TLR7 dráhu, ale produkci IFN I zprostředkovanou aktivací RIG-I. V případě těsného buněčného kontaktu pDC s buňku infikovanou virem žluté zimnice se však naopak RIG-I neaktivuje a produkce IFN I je zprostředkována aktivací TLR7 (Bruni et al. 2015). To, že detekce infikovaných buněk je závislá na TLR a nikoli na RLR, již bylo popsáno i viru FV, HIV, HCV a LCMV (Bruni et al. 2015; Lepelley et al. 2011; Rua et al. 2012; Takahashi et al. 2010; Wieland et al. 2014). Přenos virových RNA do endosomálního kompartmentu se tak může odehrávat pomocí autofagie virových RNA, které se dostaly skrze zmíněné cytoplasmatické můstky do pDC. Do autofagosomu se poté mohou dostat ER váčky s TLR7/9 a spustit IFN I odpověď, nebo celý autofagosom splyne s endosomem s již připravenými TLR7/9 (Lee et al. 2007). Další možností je detekce defektních částic nebo přenos virových RNA, případně DNA, pomocí exosomů. Ty jsou poté endocytovány pDC, transportovány do endosomu, kde jsou virové nukleové kyseliny detekovány pomocí TLR (Décembre et al. 2014; Dreux et al. 2012).

2.4.6 Exosomy

Nejlépe charakterizovanou skupinou mikrováček, které do svého okolí sekretuje mnoho typů buněk, jsou exosomy. Tyto váčky obklopené dvojitou membránou se velikostně pohybují kolem 40-100 nm. Na svém povrchu mají různé receptory a uvnitř váčku proteiny či RNA. Jedná se o komplexní komunikační síť signalizující jak na krátkou, tak velkou vzdálenost. Pomocí exosomů dochází k regulaci imunitní odpovědi a svou úlohu hrají i v šíření viru (Ramakrishnaiah et al. 2013; Théry et al. 2009; Wang et al. 2017; Yang et al. 2017). Exosomy derivované od HCV a LCMV infikovaných buněk

byly popsány jako aktivační signál pro produkci IFN I v pDC. Tato aktivace exosomy při kokultivaci je však závislá na buněčném kontaktu pDC s infikovanou buňkou. Díky krátké vzdálenosti mezi buňkami jsou exosomy schopny ve velkém počtu vstoupit do pDC a překročit tak pravděpodobně určitý práh aktivace pro produkci IFN I (Dreux et al. 2012; Takahashi et al. 2010; Wieland et al. 2014). Role exosomů však nebude spjata pouze s aktivací IFN I odpovědi. Kromě aktivačních signálů mohou exosomy nést proteiny navozující antivirový stav nebo mikro RNA (miRNA), které mohou působit i inhibičně na produkci IFN I (Alenquer a Amorim 2015; Ansari et al. 2013; Fu et al. 2017; Kalamvoki et al. 2014; Zhu et al. 2015). Obecně tak nelze striktně tvrdit, že některé viry jsou nedetekovatelné a nespouští v pDC produkci IFN I, jelikož jejich detekce se může odehrávat pouze na úrovni interakce pDC s infikovanou buňkou nebo pomocí exosomů. Stejně tak může virus efektivně zablokovat produkci IFN I ještě před jeho rozeznáním pDC (Wieland et al. 2014).

Studium IFN I dráhy je cílem mnoha skupin a předmětem mnoha let studií. Některé poznatky byly popsány na pDC spolu s mDC či makrofágách, tudíž si lze vytvořit možnou představu o mechanismu indukce a regulace IFN I (Hervas-Stubbs et al. 2011; Pauls et al. 2012; Pertsovskaya et al. 2013; Tailor et al. 2007). Další studie jsou však potřeba k přesnému popisu mechanismu indukce a regulace produkce IFN I. Následně by však tyto poznatky mohly mít vysoké uplatnění v terapeutické léčbě chronických virových onemocnění a autoimunitních chorob.

3 CÍLE PRÁCE

Cílem této práce bylo studovat vliv malých DNA virů na regulaci tvorby IFN I. Prvním cílem bylo charakterizovat signalizační dráhy vedoucí k tvorbě interferonu a prozánětlivých cytokinů v pDC. Následně byl jako modelový malý DNA virus zvolen lidský BKV. Ústřední otázkou této práce bylo zjistit schopnost pDC rozpoznat BKV ve formě volných částic, případně ve formě infikovaných buněk HRPTEC.

3.1 Část 1

Charakterizovat klíčové komponenty TLR signální dráhy

Konkrétní cíle:

- Zjistit vliv inhibitorů signalizačních komponent na produkci cytokinů.
- Popsat vliv regulačních komponent na produkci IFN- α .

3.2 Část 2

Určit, zda je BK virus rozpoznáván pDC

Konkrétní cíle:

- Zjistit, zdali BK virus aktivuje pDC.
- Zjistit, zdali má BK virus inhibiční účinek na pDC.
- Určit schopnost pDC detekovat BKV infikované buňky HRPTEC.
- Určit podmínky, za jakých je virus rozpoznáván.
- Zjistit, jaký receptor je zodpovědný za detekci viru.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

4.1.1 Chemikálie

Agaróza pro elektroforézu (Amresco)
Akrylamid (Serva)
APS - amonium persulfát (Serva)
 β -merkapt ethanol (Serva)
BSA - bovinní sérový albumin (Sigma)
Bromfenolová modř (Serva)
dNTPs - deoxyribonukleosid trifosfáty (Sigma)
DMSO - dimethylsulfoxid (Sigma)
EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina (Serva)
Ethanol (Penta)
Glycerol (Penta)
Glycin (Serva)
 H_2O_2 - Peroxid vodíku (Sigma)
HCl – kyselina chlorovodíková (Lachema)
Kyselina p-kumarová (Sigma)
Kvasničný autolyzát (Imuna)
Luminol (Serva)
MetOH - Methanol (Lachema)
 Na_2CO_3 – uhličitan sodný
 $NaHCO_3$ – hydrogenuhlíčan sodný
NaOH – hydroxid sodný (Penta)
Nutrient agar N2 (Biolife)
Pepton (Imuna)
PFA - Paraformaldehyd (Sigma)
SDS - dodecylsulfát sodný (Sigma)
Sušené mléko (Laktino)
TEMED - N,N,N',N' - Tetramethylethylendiamin (Sigma)
TRIS - Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Serva)
Triton X-100 (Roth)
Tween 20 (Fluka)

4.1.2 Bakteriální kmen a buněčné linie

Escherichia coli TOP10, genotyp: *F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) \emptyset 80lacZAM15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ* (Invitrogen)

Buněčná linie Gen2.2 – lidská leukemická linie plasmacytoidních dendritických buněk získána v rámci MTA od Etablissement francais du sang, Paříž, Francie (Chaperot et al. 2006)

Buněčná linie MS5 – myší stromální buňky, získané od German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (ACC441), Leibnitz Institute DSMZ, Braunschweig, Německo

Buněčná linie HRPTEC – primární lidská buněčná linie renálních epiteliálních buněk proximálních tubulů, (CC-2553) zakoupena od firmy Lonza, Basilej, Švýcarsko

4.1.3 Vir a virová inokula

Virová inokula byla připravena transfekcí **pBKV 34-2** plazmidu obsahujícího kmen **BKV Dunlop** (ATCC® 45025™) do buněk Huki, Vero a HRPTEC. Inokula připravila Mgr. Mariana Stančíková z dobách jejího studia v naší laboratoři. Inokula byla použita ve formě supernatantu zbaveného buněk centrifugací. Pro některé pokusy byl použit BKV virus ze supernatantu buněk HRPTEC čištěný isopyktnickou centrifugací v gradientu CsCl (II. Frakce) a připravený Mgr. Václavem Janovcem. Virová inokula HCMV (kmen AD169) a HSV-1 (kmen Praha) byly obdrženy darem od Mgr. Kateřiny Roubalové.

4.1.4 Plasmidy

pBKV_c734A - plasmid nesoucí DNA sekvenci kapsidového proteinu VP1 BK viru (připravený v naší laboratoři Mgr. Jiřinou Suchanovou Žáčkovou)

pUC 19 DNA - kontrolní plasmid (Invitrogen)

4.1.5 Primery

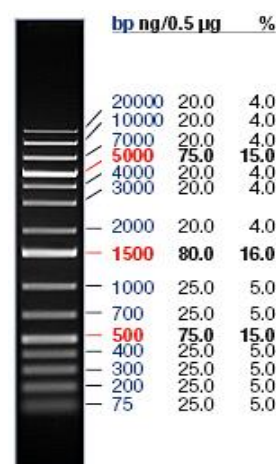
PCR primery ve směru 5' - 3' pro oblast genu pro VP1 BK viru tvořící produkt o velikosti 1061bp

BKSV40-VP1_Forward: GTC CAG GGG CAG CTC CC

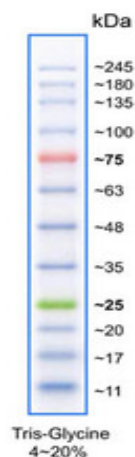
VP1 BKV_Reverse: TTAAAGCATTTTGGTTTGCAATTGTCCCTGTT

4.1.6 Markery molekulových vah

GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Life Technologies)



Black Protein Ladder 10-245 kDa (Biosystems)



4.1.7 Enzymy

Vent Dna polymeráza (New England BioLabs)

SmaI endonukleáza (Thermo Scientific)

BamHI endonukleáza (Thermo Scientific)

XbaI endonukleáza (Fermentas)

Trypsin (Sigma-Aldrich)

4.1.8 Inhibitory

TBK1/IKKe inhibitor - BX795 (Invivogen)

Calcineurin Inhibitor – Tacrolimus FK506 (Invivogen)

JNK Inhibitor – SP600125 (Invivogen)

p38 MAP kinase inhibitor – SB202190 (Invivogen)

p38 MAP kinase inhibitor – SB203580 (Invivogen)

NF-κB inhibitor - Bay 11-7082 (Sigma)

MEK1/2 inhibitor - PD032590 (Invivogen)

Inhibitor acidifikace (V-ATPase) – Bafilomycin A1 (Invivogen)

Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail (Cell Signaling Technology)

4.1.9 Stimulanty

CpGA (ODN 2216) (InvivoGen)

CpGB (ODN 2006) (InvivoGen)

PMA (InvivoGen)

4.1.10 Protilátky

4.1.10.1 Primární protilátky

RbαVP1BKV - Králíčí polyklonální protilátka proti kapsidovému proteinu VP1 BK viru připravená v naší laboratoři (Boháčová, Pappová)(ředění 500x)

MsaSV40LT [PAb416] – Myší monoklonální protilátka proti LT viru SV40 reagující i s LT BK viru (ředění 100x) (Abcam)

Anti-CD303 (BDCA-2) – Myší protilátka proti lidskému BDCA-2 (Miltenyi Biotec)

4.1.10.2 Sekundární protilátky

MaRbAlexa488 - Myší monoklonální protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 488 (ředění 1000x, Life Technologies)

DaMAlexa488 - Oslí monoklonální protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 488 (ředění 1000x, Life Technologies)

GaRbPx - Kozí monoklonální protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou (ředění 1000x, Life Technologies)

4.1.11 Kultivační média

4.1.11.1 Média pro savčí buňky

RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Lonza) + 10% fetální bovinní sérum (FBS) (Gibco) + 1% sodium pyruvát + 1% MEM neesenciální aminokyseliny (100x) (Sigma) + 1,5% Ampicilin (Biomedika)

REBMTM (Renal epithelial Cell Basal Medium, Lonza) + růstové přídavky REGMTM Single Quots (Lonza) (hEGF 0.5 ml; hydrocortisone 0.5 ml; epinephrine 0.5 ml; insulin 0.5 ml; triiodothyronine 0.5 ml; transferrin 0.5 ml; gentamicin 1000 0.5 ml; FBS 2.5 ml).

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma) + 10% FBS + 1% Ampicilin (Biomedika)

4.1.11.2 Média pro bakteriální kmeny

LB (Luria-Bertani) médium: 1% pepton, 0,5% kvasničný autolyzát, 1% NaCl

TPN médium: 2% pepton, 0,5% kvasniční autolyzát, 0,5% NaCl

SOC médium: 2% pepton, 0,5% kvasničný autolyzát, 20 mM glukóza, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂ a 10 mM MgSO₄

4.1.12 Používané roztoky

- PBS (1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄.12H₂O, 18 mM KH₂PO₄)

- promývací roztok pro metodu ELISA (PBS; 0,05% Tween20)

- 0,2M roztok H₂SO₄

- blokační roztok (0,1% BSA, 0,05% Tween20 v PBS)
- pufr pro SDS-PAGE (250 mM Tris, 1,92 M glycín, 1% SDS)
- blotovací pufr (25 mM Tris, 195 mM glycín, 20% methanol)
- Laemliho pufr 5x (3% SDS, 50 mM Tris-HCl (pH=6,8), 50% glycerol, 25% merkaptioethanol, 0,005% bromfenolová modř)
- B pufr (10 mM Tris – HCl (pH=7,4), 150 mM NaCl, 0,01 mM CaCl₂)
- TAE pufr pro agarovou elektroforézu (40mM Tris, 20mM kyselina octová, 1mM EDTA)
- chelatační roztok pro adhezivní buněčné kultury (0,25% roztok EDTA v PBS)
- RIPA pufr (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH=7,4), 1% Triton X-100, 1% deoxycholát sodný, 0,1% SDS, 0,05% NP-40)

4.1.13 Komerční soupravy a roztoky

Human IFN- α (pan specific) ELISA development kit (Mabtech)

Human TNF ELISA Set (BD OptEIA™)

Human IL-6 ELISA development kit (Mabtech)

GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma)

TMB Substrate Reagent Set (BD OptEIA™)

CryoStor® Cell cryopreservation media (Sigma)

Ficoll® Paque Plus (GE Healthcare)

Nunc MaxiSorp™ immuno plate (ThermoFisher Scientific)

4.2 Metody

4.2.1 Práce s bakteriemi

4.2.1.1 Příprava kompetentních buněk pro elektroporaci

Bakteriální kultura *Escherichia coli* byla inokulována do 15 ml TPN média a inkubována 16 hodin v třepačce při 200 rpm a teplotě 37°C. Poté byla spektrofotometrem změřena optická denzita při vlnové délce 560 nm. Pro dosažení optické density 0,1 byla bakteriální kultura naředěna do 600 ml TPN a kultivována při 37°C do dosažení optické density v rozmezí mezi 0,5 – 0,7. Kultura byla následně centrifugována v 50ml zkumavkách 10 minut při 4000 rcf a teplotě 4°C. Pelet byl resuspendován v 600 ml vychlazené ddH₂O a znovu centrifugován 10 minut při 4000 rcf a teplotě 4°C. Po centrifugaci byl pelet resuspendován pouze ve 300 ml vychlazené ddH₂O a centrifugován

10 minut při 4000 rcf a teplotě 4°C. V dalším kroku již byl pelet resuspendován ve 24 ml 10% glycerolu a centrifugován 10 minut při 4000 rcf a teplotě 4°C. Pelet byl poté resuspendován ve 12 ml 10% glycerolu a centrifugován 10 minut při 4000 rcf a při teplotě 4°C. Nakonec byl pelet resuspendován v 1,2 ml 10% glycerolu a rozpipetován do zkumavek po 100 µl. Zkumavky byly nejprve ponořeny do tekutého dusíku a po zmražení byly uskladněny při teplotě -80 °C.

4.2.1.2 Elektroporace a kultivace transformovaných buněk

K 50 µl na ledu rozmražených kompetentních buněk byly přidány 2 µl plasmidové DNA a poté byla jemně promíchaná suspenze buněk napipetována do vychlazené elektroporační kyvety. Kyveta byla vystavena výboji o 2500 V po dobu 3 ms v elektroporátoru (Eporator, Eppendorf). Po výboji byl k bakteriím rychle přidán 1 ml SOC média o laboratorní teplotě a suspenze následně jemně promíchána. Poté byla převedena do Erlenmayerových baněk a krátce kultivována na třepačce při 37 °C a 200 rpm. Na pevné agarové plotny s přidaným ampicilinem byla následně vyseta suspenze bakterií a ponechána kultivovat přes noc při 37 °C v termostatu. Z kolonií narostlých na agarových plotnách byl pomocí párátko odebrán vzorek kolonie a inokulován do Erlenmayerovy baňky s 8 ml tekutého LB média. Bakterie byly poté kultivovány 16 hodin v třepačce při teplotě 37 °C a 150 rpm.

4.2.1.3 Příprava bakteriálních konzerv

Po 16 hodinách kultivace bakterií bylo 400 µl suspenze buněk a přidáno k 600 µl 50% glycerolu. Suspenze byla poté zmrazena a uskladněna při -80 °C.

4.2.2 Práce s buněčnými liniemi

4.2.2.1 Kultivace buněk MS5

Myší stromální buněčná linie byla kultivována v 250ml kultivačních lahvích v termostatu při teplotě 37 °C a 5% CO₂. Z konfluentně narostlých buněk bylo odsáto médium a buňky byly opláchnuty 3 ml 0,25% roztoku EDTA v PBS). Roztok byl odsát, k buňkám přidán 1 ml 1% roztoku trypsinu a buňky inkubovány 5 minut v termostatu při teplotě 37 °C a 5% CO₂. Po uvolnění buněk z podkladu bylo do kultivační lahve přidáno 20 ml média DMEM s 10% FBS inaktivujícím trypsin a buňky důkladně resuspendovány. Buňky byly pasážovány v poměru 1:4 jednou za dva týdny, přičemž médium bylo měněno jednou za týden. Buňky byly ponechány narůst cca 10 dní do stavu úplné

konfluence. Poté byly použity jako „feeder“ pro kultivaci suspenzní linie Gen2.2 (viz kapitola 4.2.2.2). Kultivace samotných buněk MS5 probíhala v DMEM médiu s 10% FBS a 1% antibiotiky. Později, kdy byla k buňkám přidána buněčná linie Gen2.2, byly společně kokultivovány v médiu pro buňky Gen2.2.

4.2.2.2 Kultivace buněk Gen2.2

Buněčná linie Gen2.2 spolu s konfluentně narostlými buňkami MS5 byla kokultivována v 250ml kultivačních lahvích v termostatu při teplotě 37 °C a 5% CO₂. Kultivace probíhala v RPMI 1640 médiu s přidaným L-glutaminem, 10% FBS, 1% antibiotiky, 1% sodium pyruvátém a 1% MEM neesenciálními aminokyselinami. Buňky byly pasážovány každé 2 až 3 dny na koncentraci 300 – 400 tisíc buněk/ml. Z celkového objemu 20 ml buněčné suspenze bylo z kultivační lahve odebráno 10 ml a byla spočtena koncentrace buněk. V případě nízké koncentrace byla část odebraných buněk centrifugována 5 minut při 300 rcf a teplotě 25 °C. Po centrifugaci byl pelet naředěn 10 ml čerstvého média a suspenze buněk navracena do kultivační lahve a do termostatu.

4.2.2.3 Počítání buněk Gen2.2

Z kultivační lahve bylo odebráno malé množství lehce promíchané suspenze buněk a aplikováno pod krycí sklo Bürkerovy komůrky. Bylo spočteno množství buněk nacházejících se uvnitř 16 náhodných čtverců o straně 0,2 mm a dotýkajících se dvou vybraných stran čtverce. Průměrné množství buněk nacházejících se ve vybraných čtvercích odpovídá průměrnému množství buněk v médiu o objemu 1/250 mm³. Celková koncentrace buněk v 1 ml byla vypočítána vynásobením průměrného počtu buněk ve čtverečku o straně 0,2 mm číslem $2,5 \times 10^5$.

4.2.2.4 Testování inhibitorů signálních komponent, BKV a stimulace buněk Gen2.2

Pro účely testování cytokinové produkce v přítomnosti různých inhibitorů/BKV inokula byly buňky naředěny médiem tak, aby výsledná koncentrace buněk po přidání inhibičních či stimulačních látek byla 1 milion buněk/ml. Buňky byly vysety na 96 jamkovou destičku v objemu 90 µl na jamku. Do každé jamky bylo přidáno 5 µl vhodně naředěného inhibitoru v médiu/BKV inokula a jako negativní kontrola bylo použito stejně naředěné DMSO/mock. Buňky byly ponechány hodinovému působení inhibitorů/BKV inokula v termostatu při teplotě 37 °C a 5% CO₂. Poté bylo k buňkám přidáno 5 µl vhodně

naředeného stimulačního CpGA nebo CpGB a jako negativní kontrola bylo použito stejné množství vody. Stimulace probíhala přes noc 18 nebo 24 hodin v termostatu při teplotě 37 °C a 5% CO₂. Poté byly buňky centrifugovány 5 minut při 300 rcf a při teplotě 25 °C. Bezbuněčné supernatanty byly odebrány a zmrazeny při -20 °C pro budoucí testování.

4.2.2.5 Kultivace buněk HRPTEC

Konzerva HRPTEC byla rozmrazena, její obsah přenesen do 9 ml REBM média a suspenze centrifugována 5 minut při 300 rcf při teplotě 25 °C. Všechny supernatant byl důkladně odsát, pelet resuspendován v 10 ml čerstvého kultivačního média a po 5 ml vyset na kultivační misky o průměru 6 cm. Buňky byly kultivovány v termostatu do dosažení konfluence při teplotě 37 °C a 5% CO₂. Následně bylo buňkám odsáto médium a byly opláchnuty 3 ml 0,25% roztoku EDTA v PBS. Po odsátí roztoku bylo k buňkám přidáno 300 µl 1% roztoku trypsinu. Po 5 minutách inkubace v termostatu bylo k buňkám přidáno 5 ml média DMEM s 10% FBS pro inaktivaci trypsinu. Buňky byly důkladně resuspendovány a poté centrifugovány 5 minut při 300 rcf a při teplotě 22 °C. Veškeré médium bylo důkladně odsáto a buněčný pelet byl poté resuspendován ve 4 ml REBM média. Na misku o průměru 6 cm byl přidán 1 ml buněčné suspenze do 4 ml média a na misku o průměru 10 cm byly přidány 2 ml buněčné suspenze do 8 ml média REBM. Buňky byly pasážovány každý sedmý den v poměru 1:4.

4.2.2.6 Tvorba konzerv buněk HRPTEC

Samostatná konzerva byla připravena z konfluentně narostlých buněk na jedné misce s průměrem 10 cm nebo na dvou miskách s průměrem 6 cm. Buňky byly zbaveny média, opláchnuty 3 ml 0,25% roztoku EDTA v PBS a inkubovány s 300 µl 1% roztoku trypsinu při 37°C. Poté bylo k buňkám přidáno 5 ml DMEM média s 10% FBS a důkladně resuspendovaná suspenze buněk byla poté centrifugována 5 minut při 300 rcf a teplotě 22 °C. Supernatant byl odstraněn a pelet resuspendován v 1ml CryoStor® mrazícího média. Suspenze byla převedena do kryozkumavky a ponechána 10 minut při 4°C. Poté byla dána do vychlazeného mrazícího bločku s izopropanolem (4°C) a spolu s bločkem umístěna do -80°C. Po zmrznutí byla konzerva uskladněna v tekutém dusíku.

4.2.2.7 Infekce buněk HRPTEC a pomnožení viru BKV

Buňky HRPTEC byly vysety na misku o průměru 10 cm a ponechány narůst do 70% konfluence. Po odsátí média bylo buňkám přidáno 500 µl virového inokula a

ponecháno hodinu inkubovat v termostatu při teplotě 37 °C a 5% CO₂. Poté bylo inokulum odsáto a k buňkám přidáno 10 ml čerstvého média. Miska byla ponechána 8 dní v termostatu při 37 °C a 5% CO₂. Poté byla miska třikrát zmrazena a rozmrazena. Médium bylo centrifugováno 5 minut při 300 rcf a teplotě 24 °C. Supernatant byl uschován při -4 °C a použit pro budoucí infekce.

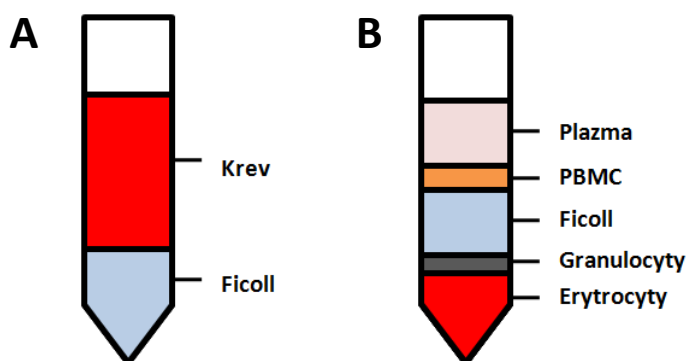
4.2.2.8 Kokultivace HRPTEC s Gen2.2

Buněčná linie HRPTEC byla pasážována a vyseta na 24 jamkovou destičku se sklíčky nebo na 96 jamkovou destičku. Buňky byly ponechány v termostatu při 37°C a 5% CO₂, dokud nedosáhly 70% konfluence. Poté bylo médium odsáto a buňky inkubovány 1 hodinu v objemu 200 µl virového inokula. Po hodině inkubace bylo inokulum odsáto a k buňkám přidány buňky Gen2.2 naředěné na koncentraci 1 milion buněk/ml kultivačního média pro buňky HRPTEC spolu nebo bez přidání inhibitorů a stimulantů. V případě experimentu kokultivace bez buněčného kontaktu, byly do 24 jamkové destičky s buňkami HRPTEC zasazeny transwellové komůrky, do nichž byla následně opatrně napipetována suspenze buněk Gen2.2 Supernatanty byly odebrány v určeném časovém rozmezí a následně otestovány na přítomné cytokiny.

4.2.3 Práce s primárními buňkami

4.2.3.1 Izolace PBMC

Čerstvé krevní vzorky od zdravých dárců (obdrženy z ÚHKT) byly vypuštěny z krevního vaku do kádinky a naředěny 2 – 4x PBS pufrem. Do 50ml zkumavek bylo napipetováno 15 ml roztoku Ficoll a na jeho hladinu opatrně navrstveno 30 ml naředěného krevního vzorku tak, aby nedošlo k promíchání obou roztoků (Obrázek 12A). Vzorky byly poté centrifugovány 25 minut při 400 rcf a teplotě 25 °C. Po centrifugaci se na hladině roztoku Ficoll vytvořil prstenec živých PBMC oddělující horní plazmu od spodního Ficollu (Obrázek 12B). Prstenec byl opatrně odebrán a samostatně centrifugován 10 minut při 300 rcf a teplotě 25 °C. Všechny supernatant byl opatrně odsát, pelet promyt 30 ml PBS a vzorky znovu centrifugovány 10 minut při 200 rcf a teplotě 25 °C.



Obrázek 12 Izolace PBMC z krve. (A) Zkumavka krve navrstvené na roztoku Ficoll před centrifugací. (B) Uspořádání zkumavky po centrifugaci. Na dně patrný velký pelet erytrocytů následovaný prstencem granulocytů. Viditelný prstenec PBMC ve středu zkumavky oddělující horní plazmu a spodní roztok Ficoll.

4.2.3.2 Testování inhibitorů signálních komponent a stimulace PBMC

Konzervy PBMC od zdravých donorů byly rozmrazeny a buňky spočteny. Buňky byly přidány k 10 ml média RPMI a centrifugovány 5 minut při 300 rcf a teplotě 25 °C pro odstranění DMSO. Po centrifugaci byly buňky naředěny médiem RPMI tak, aby výsledná koncentrace byla 3 miliony buněk/ml. Postup je nadále totožný jako u Gen2.2 buněčné linie (viz kapitola 4.2.2.4).

4.2.4 Práce s DNA

4.2.4.1 Izolace plasmidu

Z baňky s přes noc narostlou kulturou *E. coli* (viz kapitola 4.2.1.2) bylo odebráno 5 ml suspenze a centrifugováno 7 minut při 4000 rcf při 20°C. Na izolaci plasmidu ze vzniklého peletu byl použit komerční izolační kit GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma). Izolace tak byla nadále prováděna podle přiloženého protokolu výrobce.

4.2.4.2 Stanovení koncentrace plasmidu

Množství vyizolované DNA v roztoku bylo stanoveno pomocí přístroje Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Pro analýzu byly použity 2 µl roztoku DNA. Měření probíhalo dle instrukcí výrobce a programu.

4.2.4.3 Štěpení plasmidu restriční endonukleázou

Sekvence DNA byla analyzována na přítomnost restričních míst a následně byly zvoleny vhodné restriční endonukleázy s maximální aktivitou pro dané místo spolu

s vhodným pufrům. Na štěpení bylo použito 5 µg vyizolované DNA v celkovém objemu 20 µl restrikční směsi. Množství přidané restrikční endonukleázy bylo zvoleno dle instrukcí výrobce. Restrikční směs byla důkladně promíchána a inkubována 16 hodin v 37 °C.

Restrikční směs: 0,5 µl restrikční endonukleázy
2 µl restrikčního pufru (ředění 1:10)
5 µg DNA
ddH₂O pro doplnění směsi na 20 µl

4.2.4.4 PCR

Pro zjištění přítomnosti virové DNA v médiích po transfekci buněk Vero a Huki buněk virovým plasmidem a v médiích po infekci HRPTEC BK virem byly inokula podrobeny polymerázové řetězové reakci. Amplifikovaný úsek DNA měl délku 1061 bp. Objem PCR směsi činil 20 µl. Reakce probíhala v přístroji Thermocycler GenePro (Bioer)

PCR směs: 1 µl templátové DNA/média
2 µl TritonX-100
0,2 µl Vent DNA polymerázy (New England BioLabs)
0,6 µl forward primer
1,5 µl reverse primer
2 µl Thermo Pol pufru (New England BioLabs)
0,4 µl směsi dNTP
13,2 µl ddH₂O

PCR program (30 cyklů): Denaturace DNA – 3 minuty při 94 °C

Cyklus: Denaturace DNA – 30 sekund při 94 °C
Nasedání primerů– 30 sekund při 49 - 62 °C
Polymerace – 60 sekund při 72 °C

Závěrečná polymerace – 5 minut 72 °C

4.2.4.5 Agarózová elektroforéza

Na elektroforetickou separaci DNA byl rozpuštěním 0,4 g agarózy ve 40 ml TAE pufru připraven 1% gel. Rozpuštění agarózy bylo docíleno opakovaným zahříváním roztoku v mikrovlnné troubě. Poté byla do mírně vychladlého roztoku přidána GelRed™

(Biotium) fluorescenční barvička v poměru 1:10000 a po důkladném zamíchání byl roztok nalit do připraveného bločku s hřebenem. Po ztuhnutí byl hřeben vytažen, bloček s gelem zasazen do elektroforetické aparatury a přelit TAE pufrem. Do jamek byly naneseny vzorky z restrikčního štěpení s přidanou bromfenolovou modří a marker. Aparatura byla připojena k elektrickému zdroji s intenzitou elektrického pole 5V/cm. Elektroforéza byla ukončena poté, co bromfenolová modř doputovala k okraji gelu. Gel byl poté vyjmut a vyvolán pod UV transiluminátorem InGenius3 (Syngene).

4.2.4.6 Kvantifikace genomových ekvivalentů BKV v inokulu pomocí metody real time PCR

Z vyizolovaného pBKV plazmidu (viz kapitola 4.2.4.1) o známé koncentraci byla připravena desítková ředící řada o koncentracích 330 ng/ml, 33 ng/ml, 3 ng/ml, 0,33 ng/ml, 0,033 ng/ml a 0,0033 ng/ml, ze které byla následně stanovena standardní křivka. Množství genomových ekvivalentů BKV bylo stanoveno v inokulu připraveném z buněk HRPTEC. Inokula byla použita v ředěních 1x, 10x a 100x. Celkový objem reakční směsi byl 10 µl, přičemž se skládala z 1 µl virového inokula a 9 µl reakční směsi obsahující 5 µl iQTM SYBR® Green Supermix, 2 pmol primerů a ddH₂O. Takto byla směs napipetována do mikrodestičky, překryta folií a centrifugována 2 minuty při 1620 rpm při 22°C. Reakce poté probíhala v přístroji Light Cycler 480II (Roche).

Program:

Iniciace	- 5 minut při 95°C
Amplifikace	- 40x 95°C 10 s, 60°C 20 s, 72°C 30 s
Analýza tání	- 72°C 5 minut, 65°C 1 minuta, 97°C
Závěr	- 37°C 10 minut

Data byly následně analyzovány v programu Light Cycler R 480.

4.2.5 Práce s proteiny

4.2.5.1 Příprava buněčného lyzátu

Miska o průměru 6 cm s narostlými HRPTEC byla zbavena média, opláchnuta 3 ml 0,25% roztoku EDTA v PBS a inkubována s 300 µl 1% roztoku trypsinu po dobu 5 minut v termostatu. K buňkám bylo přidáno 5 ml média, suspenze buněk byla převedena do zkumavky, centrifugována 5 minut při 300 rcf a teplotě 20 °C a po odsátí supernatantu promyta 2 ml PBS a opět centrifugována. Supernatant byl odsát a buněčný pelet byl následně resuspendován ve 250 µl RIPA pufru s 2,5 µl inhibitoru proteáz

Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail. Směs byla důkladně promíchána a ponechána na ledu 20 minut. Poté byla směs centrifugována 1 minutu při 20 000 rpm a teplotě 4 °C. Supernatant byl převeden do nové zkumavky a uskladněn při -20 °C.

4.2.5.2 SDS polyakrylamidová elektroforéza

Nejdříve byla sestavena aparatura pro přípravu akrylamidových gelů a její těsnost byla ověřena neklesající hladinou dH₂O. Poté byla aparatura zbavena vody, vypláchnuta etanolem a důkladně vysušena. Do aparatury byl poté šetrně nalit 10% polyakrylamidový gel (4 ml polyakrylamidu (30%), 4,6 ml 1 M TRIS-HCl (pH=8,8), 120 µl 10% SDS, 3,25 ml ddH₂O, 40 µl 10% APS, 8,5 µl TEMED) a převrstven 1 ml vody. Po ztuhnutí gelu byla voda odstraněna a na gel byl nanesen 5% polyakrylamidový gel (1 ml polyakrylamidu (30 %), 750 µl 1 M TRIS-HCl (pH=6,8), 60 µl 10% SDS, 4,44 ml ddH₂O, 40 µl 10% APS, 10 µl TEMED). Nakonec byl do aparatury zasazen hřeben a gel byl ponechán ztuhnout. Během tuhnutí gelu byl ke 4 dílům každého vzorku lyzátu přidán jeden díl 5x koncentrovaného Laemliho pufru. Směs byla povařena 5 minut při teplotě 100 °C a poté centrifugována 1 minutu při 20000 rcf. Po ztuhnutí byla sestavena elektroforetická aparatura s připravenými gely bez hřebenů a zalita pufrem. Vzniklé jamky od hřebenu byly propláchnuty stříkačkou s pufrem a následně do nich bylo nanášeno 5-10 µl vzorku. Po dobu 30 minut probíhala elektroforéza při napětí 8 V/cm a další 2 – 3 hodiny při napětí 10 V/cm.

4.2.5.3 Western blot

Po spuštění elektroforézy byl připraven blotovací pufr a dán vychladit na 4 °C. Po skončení elektroforézy byl polyakrylamidový gel vyjmut z aparatury a vložen do misky s blotovacím pufrem. Následně byl v druhé misce s blotovacím pufrem připraven blotovací sendvič, sestavený prvně z 3 filtračních papírů, poté jedné vrstvy Whatman papíru a dále nitrocelulózové membrány AmershamTM ProtranTM 0,4 µm NC (GE Healthcare). Na nitrocelulózovou membránu byl položen polyakrylamidový gel a následně byl překryt Whatman papírem a 3 filtračními papíry. Každá vrstva sendviče byla při pokládání navlhčena v pufru a opatně položena, aby mezi vrstvami nevznikly bubliny vzduchu. Po sestavení sendviče byla připravena blotovací aparatura (TE22, Amersham Biosciences) a umístěna na magnetickou míchačku. Do aparatury byl vložen sestavený blotovací sendvič a zalit vychlazeným blotovacím pufrem. Blotování probíhalo po dobu

3 hodin při 0,8mA/cm². Po skončení byl sendvič rozebrán a nitrocelulózová membrána vyjmuta pro následnou imunodetekci proteinů.

4.2.5.4 Imunodetekce proteinů na membráně

Přebloťovaná nitrocelulózová membrána byla po vyjmutí z blotovacího sendviče inkubována na kývačce v 5% odtučněném mléce v PBST (PBS + Tween 20 0,1%) po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Následně byla membrána přes noc inkubována s primární protilátkou, která byla naředěna na doporučenou koncentraci v 5% mléce v PBS. Po inkubaci byla membrána promyta 3x10 minut roztokem PBST a dále půl hodiny při pokojové teplotě inkubována v sekundární protilátce naředěné v 5% odtučněném mléce v PBST. Po inkubaci byla membrána promyta 3x10 minut v PBST. Poté byly připraveny vyvolávací roztoky A a B. Roztok A byl připraven z 18 ml dH₂O, 2 ml TRIS-HCl (pH=8,5), luminolu a kyseliny p-kumarové. Roztok B byl připraven z 18 ml dH₂O, 2 ml TRIS-HCl (pH=8,5) a 30 µl 30% peroxidu vodíku. Po promytí byla membrána inkubována 30 sekund se smíchanými roztoky A a B. Následně byla membrána vyjmuta z misky s roztoky, lehce osušena, položena do fólie a vložena do přístroje Amersham™ Imager 600 (GE Healthcare), ve kterém byla digitálně vyhodnocena intenzita luminiscence membrány.

4.2.5.5 Detekce cytokinů pomocí ELISA metody

Do 96 jamkové destičky Maxisorp Nunc-Immuno (Thermo Scientific) bylo napipetováno 50 µl naředěné „coating“ protilátky proti danému cytokinu na jamku a destička byla inkubována přes noc při 4 °C. Po inkubaci byla destička jednou promyta v PBST (0,05% Tween20 v PBS) a následně hodinu blokována 200 µl blokačního pufru (PBS + Tween20 0.05% + BSA 0.1%) na jamku v pokojové teplotě. Během blokace byla připravena ředící řada standardu a supernatanty vhodně naředěné v blokačním pufru. Poté byla destička zbavena blokačního pufru, vzorky spolu se standardy byly napipetovány do jamek a inkubovány 2 hodiny při pokojové teplotě. Destička byla poté promyta 3x 200 µl PBST a při pokojové teplotě inkubována 1 hodinu s biotinylovanou protilátkou naředěnou v blokačním pufru. Následně byla destička promyta 3 x 200 µl PBST a při pokojové teplotě inkubována 1 hodinu se streptavidinem s konjugovanou křenovou peroxidázou. Po inkubaci byla destička promyta 5 x 200 µl PBST. Do každé jamky bylo přidáno 50 µl substrátového roztoku TMB Substrate Reagent Set (BD OptEIA™). Po

zbarvení byla reakce zastavena přidáním 50 μ l 0,2M roztoku H_2SO_4 . Absorbance byla měřena při 450 nm přístrojem Infinite 200 PRO (Tecan).

4.2.5.6 Fixace a permeabilizace buněk

Sklička s narostlými buňkami byla zbavena média, opláchnuta roztokem PBS a 25 minut fixována 4 % roztokem paraformaldehydu při pokojové teplotě. Poté byla sklička opláchnuta 1 ml PBS a buňky permeabilizovány 0,5% roztokem Tritonu X-100 po dobu 5 minut. Roztok Tritonu X-100 byl odsát a sklička 3 x promyta 1 ml PBS.

4.2.5.7 Imunofluorescenční značení

Promyté, fixované a permeabilizované buňky byly hodinu inkubovány v 1 ml blokačního roztoku (1% BSA v PBS). Následně byl roztok odsát a sklička inkubována 1 hodinu ve 200 μ l primární protilátky proti VP1 vhodně naředěné v blokačním roztoku. Sklička byla 3 x promyta 10 minut roztokem PBS a poté inkubována za tmy ve 200 μ l sekundární protilátky s fluoroforem naředěné v blokačním pufru. Následovalo 3 x promytí 10 minut roztokem PBS opět za tmy. Sklička byla opatrně vyjmuta z jamek a opláchnuta destilovanou vodou. Následně byla osušena od velkých kapek vody a ponechána ve tmě oschnout. Na podložní skličko bylo kápnuto 2,5 μ l DAPI v 70% roztoku glycerolu a na kapku bylo položeno skličko stranou s narostlými buňkami. Buňky na skličkách byly analyzovány pod fluorescenčním mikroskopem (Olympus IX71).

4.2.5.8 Určení imunofluorescenčního titru

U virových inokul byl zjišťován infekční titr. Buňky HRPTEC byly ponechány narůst do 70% konfluence na skličkách ve 24 jamkové destičce. K buňkám bylo následně na jednu hodinu přidáno 200 μ l naředěného virového inokula v ředěních 10x, 100x, 1000x a 10000x. Po jedné hodině bylo inokulum odsáto a k buňkám přidáno 600 μ l čerstvého média. Buňky byly ponechány 48 hodin v termostatu při teplotě 37 °C a 5% CO_2 . Poté byly buňky fixovány a podrobeny imunofluorescenčnímu značení proti LT (viz kapitola 4.2.5.7). Sklička byla poté analyzována pod fluorescenčním mikroskopem a ze vzorku, který vykazoval ideální poměr pozitivních a negativních buněk, byl spočten imunofluorescenční titr. Na snímku sklička byl spočten celkový počet jader a počet buněk pozitivních na LT. Takto byl spočten průměrný počet pozitivních buněk z přibližně 25 zorných polí. Imunofluorescenční titr (počet infekčních virových částic v 1ml virového inokula) byl následně vypočten podle vzorce:

FFU/ml. = Průměr počtu pozitivních buněk v zorném pole x faktor přepočtu x ředění virového inokula x (1ml/objem inkubovaného inokula v ml)

Faktor přepočtu: zvětšení 10x – 54

 zvětšení 20x – 211

 zvětšení 40x – 844

4.2.6 Sterilizace laboratorních potřeb a roztoků

Špičky, zkumavky a mikrozukavky byly sterilizovány při teplotě 127 °C a tlaku 120 kPa v autoklávu po dobu 30 minut. Roztoky byly sterilizovány při teplotě 127 °C a tlaku 120 kPa v autoklávu po dobu 30 minut nebo filtrací přes sterilní filtr o šířce póru 0,22 µm. Laboratorní sklo bylo sterilizováno při teplotě 160 °C horkým vzduchem po dobu 3 hodin. Bakteriologické nástroje, pinzety a mikroskopická sklíčka byly sterilizovány namočením v 96% etanolu a následně vyžihány v plamenu kahanu.

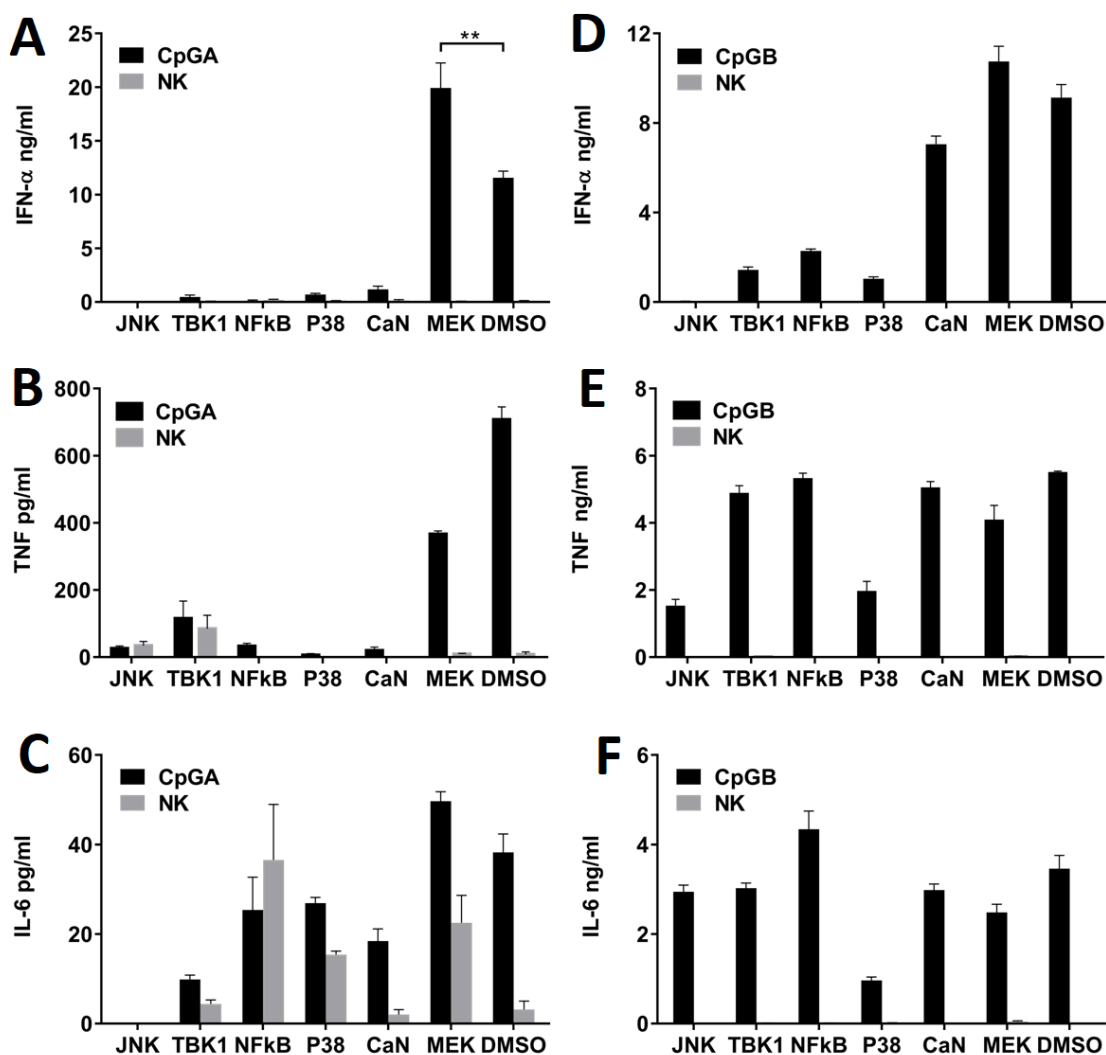
5 VÝSLEDKY

5.1 ČÁST 1 - Charakterizace TLR signální kaskády u pDC

5.1.1 Vliv inhibitorů signálních drah na produkci cytokinů

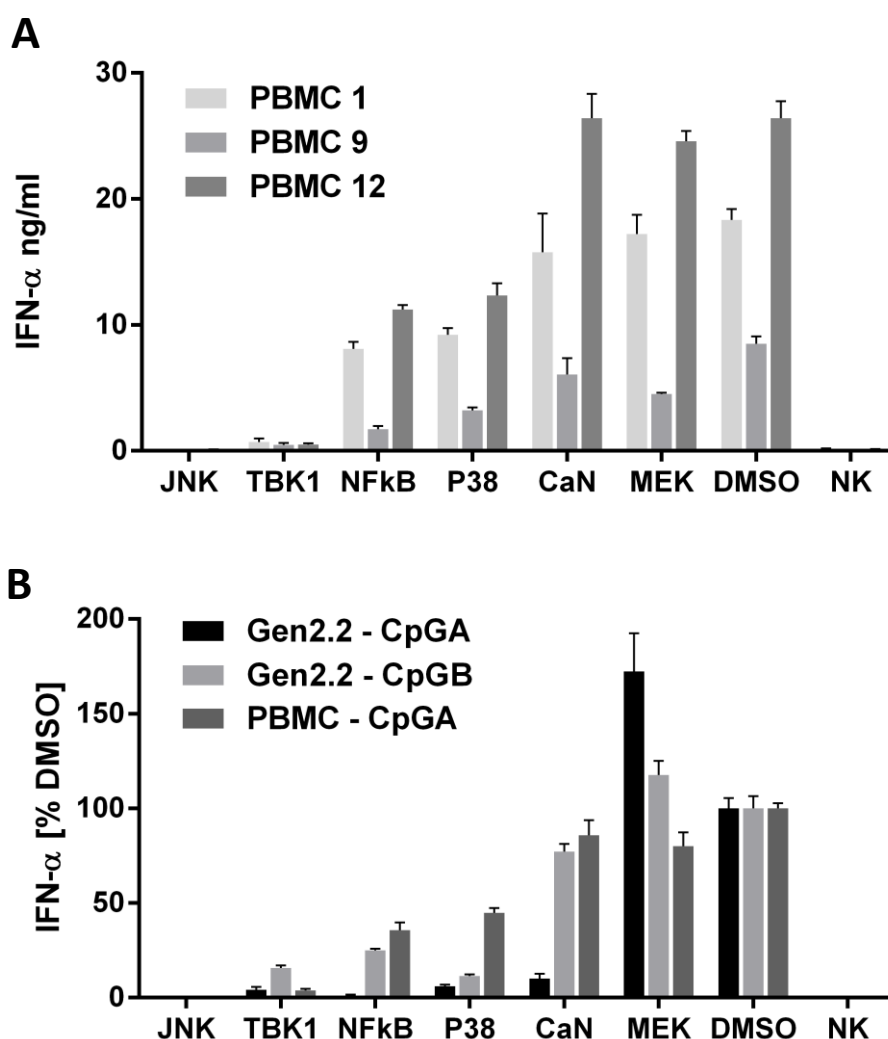
Pro studium mechanismu TLR signální dráhy vedoucí k produkci IFN- α a prozánětlivých cytokinů bylo použito 6 inhibitorů MAPK, NF κ B a vápníkové signalizace. Vliv inhibitorů na produkci cytokinů byl zkoumán u pDC buněčné linie Gen2.2, sdílející většinu vlastností s primárními pDC. Buňky Gen2.2 byly stimulovány syntetickým TLR9 ligandem CpGA nebo CpGB. Pro zjištění zapojení konkrétních signálních drah v TLR9 dráze byly použity inhibitory JNK (SP600125, 10 μ M), TBK1 (BX795, 1 μ M), NF κ B (Bay11-7082, 1 μ M), p38 (SB253080, 1 μ M), kalcineurinu (CaN) (FK506, 0.1 μ M) a MEK1/2 (PD0325901, 1 μ M). Jako negativní kontrola byla použita odpovídající koncentrace DMSO. Experiment probíhal v biologickém triplicátu v celkovém objemu 100 μ l v 96 jamkové desce. Buňky Gen2.2 byly inkubovány 1 hodinu s inhibitorem a následně stimulovány po dobu 16-18 hodin 4 μ g/ml CpGA. Použití inhibitorů JNK, TBK1, NF κ B, p38, kalcineurinu vyústilo v inhibici produkce IFN- α a TNF- α po stimulaci CpGA (Obrázek 13A,B). Inhibice MEK1/2 kinázy zvýšila produkci IFN- α (Obrázek 13A,D). Produkce IL-6 byla detekována ve velmi nízkých koncentracích, znemožňujících tak věrohodnou interpretaci výsledků (Obrázek 13C).

V případě stimulace buněk Gen2.2 pomocí 4 μ g/ml CpGB byl pozorován výrazně nižší efekt inhibice TLR9 signální dráhy v porovnání s CpGA stimulovanými buňkami Gen2.2. Inhibice MEK1/2 způsobila pouze 18% nárůst produkce IFN- α oproti 73% nárůstu při stimulaci Gen2.2 pomocí CpGA (Obrázek 13D). Stimulace buněk Gen2.2 pomocí CpGB vykazovala více jak 10 krát vyšší produkci TNF- α a 100 krát vyšší produkci IL-6. Lze u nich pozorovat i stejný vzor vlivu inhibitorů, což značí, že jejich produkce je spuštěna pravděpodobně stejnou signalizační dráhou (Obrázek 13E,F). Tyto výsledky nám ukazují odlišné zapojení signalizačních komponent po stimulaci TLR9 pomocí CpGA a CpGB, přičemž vyšší produkce IFN- α po inhibici MEK1/2 kinázy poukazuje na jeho inhibiční roli v TLR9 signalizační kaskádě.



Obrázek 13 Produkce IFN- α , TNF- α a IL-6 u buněk Gen2.2 stimulovaných CpGA (A,B,C) a CpGB (D,E,F) spolu s inhibitory JNK, TBK1, NFκB, p38, kalcineurinu (CaN) a MEK1/2 kinázy. DMSO reprezentuje pozitivní kontrolu. NK – negativní kontola. N=6, **, $p < 0.01$; oboustranný Mann–Whitneyův test. (Janovec et al. 2018)

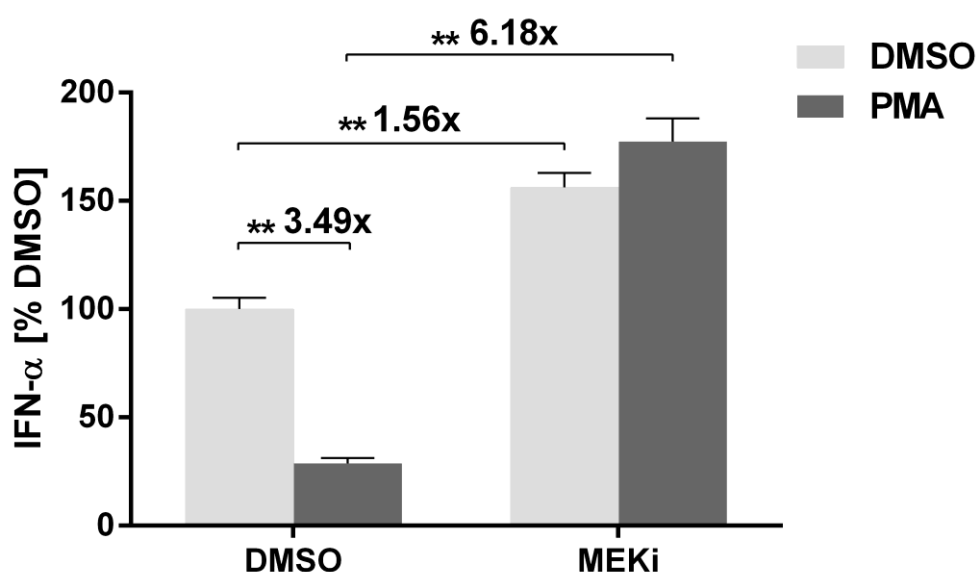
Následně byl stejný experiment vlivu inhibitorů na produkci IFN- α testován u PBMC stimulovaných pomocí CpGA. Produkce IFN- α byla zablokována pouze inhibitory JNK a TBK1, přičemž inhibice MEK1/2 kinázy nevyústila ve vyšší produkci IFN- α , jako tomu bylo u buněk Gen2.2 (Obrázek 14). PBMC obsahující primární pDC tak vykazují odlišné zapojení signalizačních komponent v porovnání s linií Gen2.2 po stimulaci CpGA. Rozdíl v produkci IFN- α u jednotlivých PBMC je dán interdonorovou variabilitou.



Obrázek 14 Stimulace PBMC vyizolovaných ze tří zdravých donorů. **(A)** Variabilita produkce IFN- α mezi donory. **(B)** Srovnání produkce IFN- α u buněk Gen2.2 a PBMC po normalizaci pozitivní kontroly bez inhibitoru (DMSO) na 100%. NK – negativní kontrola.

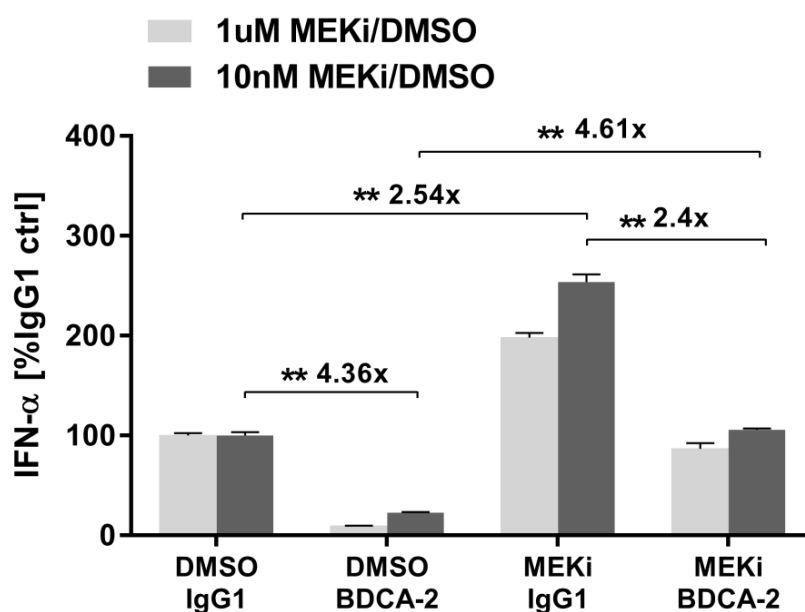
5.1.2 Vliv MEK1/2 kinázy na produkci IFN- α

Kromě inhibice MEK1/2 kinázy byl zkoumán efekt přímé aktivace MEK1/2 pomocí aktivátoru PKC kinázy phorbol myristoyl acetátu (PMA). Gen2.2 byly inkubovány s inhibitorem MEK1/2 kinázy po dobu jedné hodiny a následně další hodinu stimulovány 25 ng/ml PMA. Poté byly Gen2.2 stimulovány 4 μ g/ml CpGA po dobu 18 hodin. Stimulace za přítomnosti PMA vyústila ve výrazně nižší produkci IFN- α . Inhibice MEK1/2 tento efekt PMA zcela vykompenzovala a produkci IFN- α navrátila do obdobné hladiny, jako tomu bylo u kombinace inhibitoru MEK1/2 bez stimulace pomocí PMA (Obrázek 15).



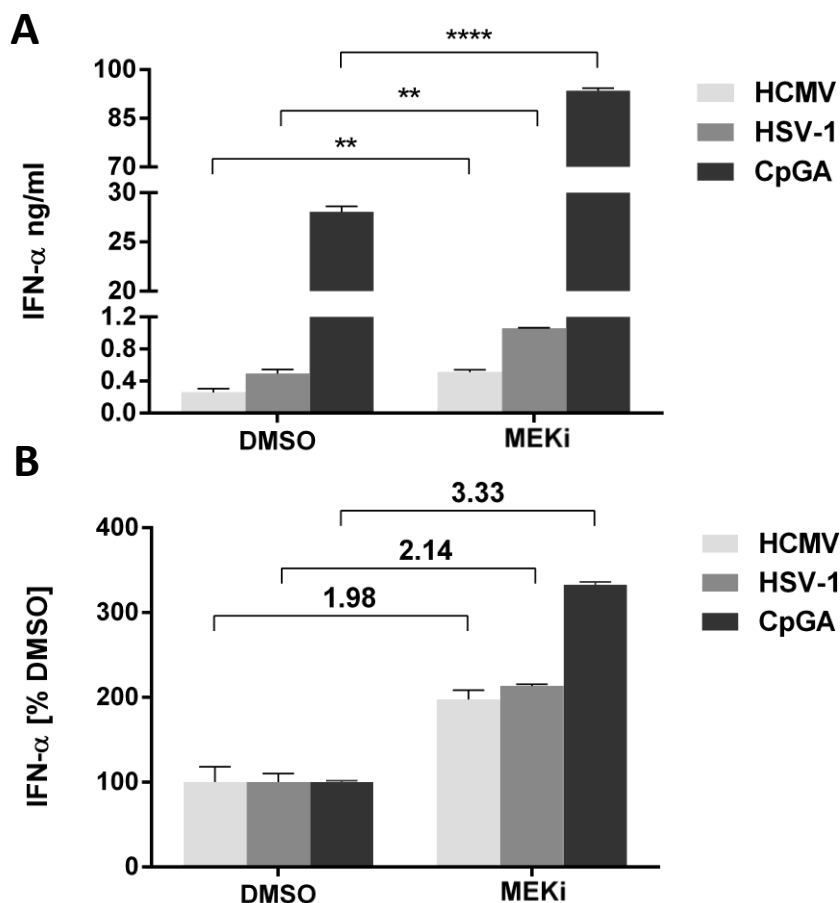
Obrázek 15 Vliv PMA a inhibitoru MEK1/2 (MEKi) na produkci IFN- α po CpGA stimulaci Gen2.2. Pokles a vzrůst produkce IFN- α po normalizaci na pozitivní kontrolu DMSO bez přítomnosti PMA a inhibitoru MEK1/2. \pm SEM, N = 6, **, $p < 0.01$, oboustranný Mann-Whitneyův test. (Janovec et al. 2018)

Vzhledem k přítomnosti regulačních receptorů na povrchu pDC byl efekt inhibice MEK1/2 kinázy zkoumán i pomocí aktivace BDCA-2 receptoru monoklonální protilátkou (mAB). Po hodině inkubace buněk Gen2.2 s inhibitem MEK1/2 bylo buňkám přidáno 20 $\mu\text{g/ml}$ protilátky cílené proti BDCA-2 receptoru a isotypová kontrola k BDCA-2 protilátce. Následně byly po hodině buňky Gen2.2 stimulovány 4 $\mu\text{g/ml}$ CpGA po dobu 18 hodin. Aktivace BDCA-2 velmi účinně snížila produkci IFN- α u Gen2.2, přičemž užitím inhibitoru MEK1/2 došlo k navrácení produkce IFN- α do obdobné hladiny odpovídající kontrole bez inhibitoru MEK spolu s isotypovou kontrolou k BDCA-2 mAb. Inhibitor MEK1/2 je alosterický inhibitor nekompetující s ATP o IC_{50} 0,33 nM, který je specifický pro panel 70 kináz ještě při 10 μM koncentraci (Bain et al. 2007). Pro zajištění specifity inhibice byly buňky Gen2.2 inkubovány s inhibitem MEK1/2 o dvou koncentracích. Stejný efekt byl pozorován u obou koncentrací, což značí velmi vysokou specifitu inhibitoru MEK1/2 kinázy i při velmi nízké koncentraci (Obrázek 16). Inhibitor MEK1/2 tak výrazně a specificky zvyšuje TLR9 mediovanou produkci IFN- α , která je jinak blokována aktivací regulačního receptoru BDCA-2.



Obrázek 16 Produkce IFN- α normalizovaná na 100% hodnoty stimulace CpGA bez inhibitoru MEK1/2 (MEKi) s IgG1 jakožto kontrolou pro BDCA-2 protilátku. Experiment byl prováděn ve dvou koncentracích MEK1/2 inhibitoru 10nM a 1 μM . $\pm\text{SEM}$, N=6, **, $p < 0.01$, oboustranný Mann-Whitneyův test. (Janovec et al. 2018)

Po zjištění, že inhibice MEK1/2 kinázy vede ke zvýšení produkce IFN- α buňkami Gen2.2 stimulovaných syntetickým ligandem CpGA, byl vliv inhibitoru MEK1/2 zkoumán na buňkách Gen2.2 stimulovaných pomocí lidského cytomegaloviru (HCMV) a herpesviru 1 (HSV-1). Již dříve bylo popsáno, že pDC jsou schopné tyto viry rozeznat pomocí TLR9 (Schuster et al. 2010; Varani et al. 2007). Za přítomnosti MEK1/2 inhibitoru byly buňky Gen2.2 stimulovány 20 μ l virového inokula HSV-1 a HCMV odpovídající MOI 10 TCID₅₀ na jednu buňku. Virová inokula HSV-1 a HCMV indukovaly u buněk Gen2.2 produkci IFN- α a za přítomnosti inhibitoru MEK1/2 se tato produkce zvýšila přibližně dvakrát (Obrázek 17). Inhibiční roli MEK1/2 kinázy na produkci IFN- α u Gen2.2 buněčné linie tak lze pozorovat u syntetické i virové stimulace TLR9.

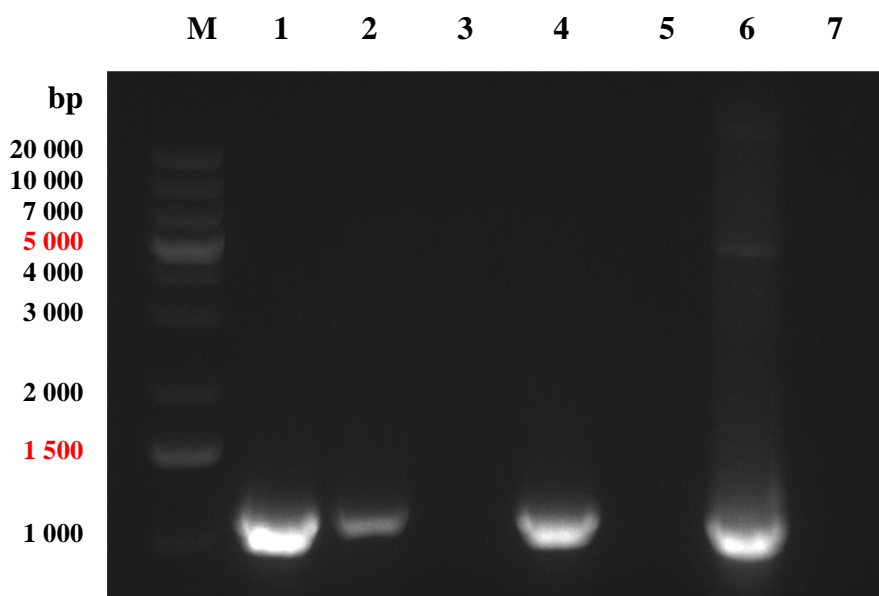


Obrázek 17 A) Vliv inhibitoru MEK1/2 (MEKi) na produkci IFN- α po stimulaci buněk Gen2.2 virovými inokuly HSV-1 a HCMV v porovnání s CpGA stimulací (4 μ g/ml). N = 3, **, p < 0.01, ****, p < 0.0001; oboustraný Studentův t-test. **B)** Vzrůst produkce IFN- α po normalizaci vzhledem k pozitivní kontrole DMSO bez inhibitoru MEK1/2. (Janovec et al. 2018)

5.2 ČÁST 2 – Vliv BK viru na pDC

5.2.1 Charakterizace a infektivita BKV virových inokul

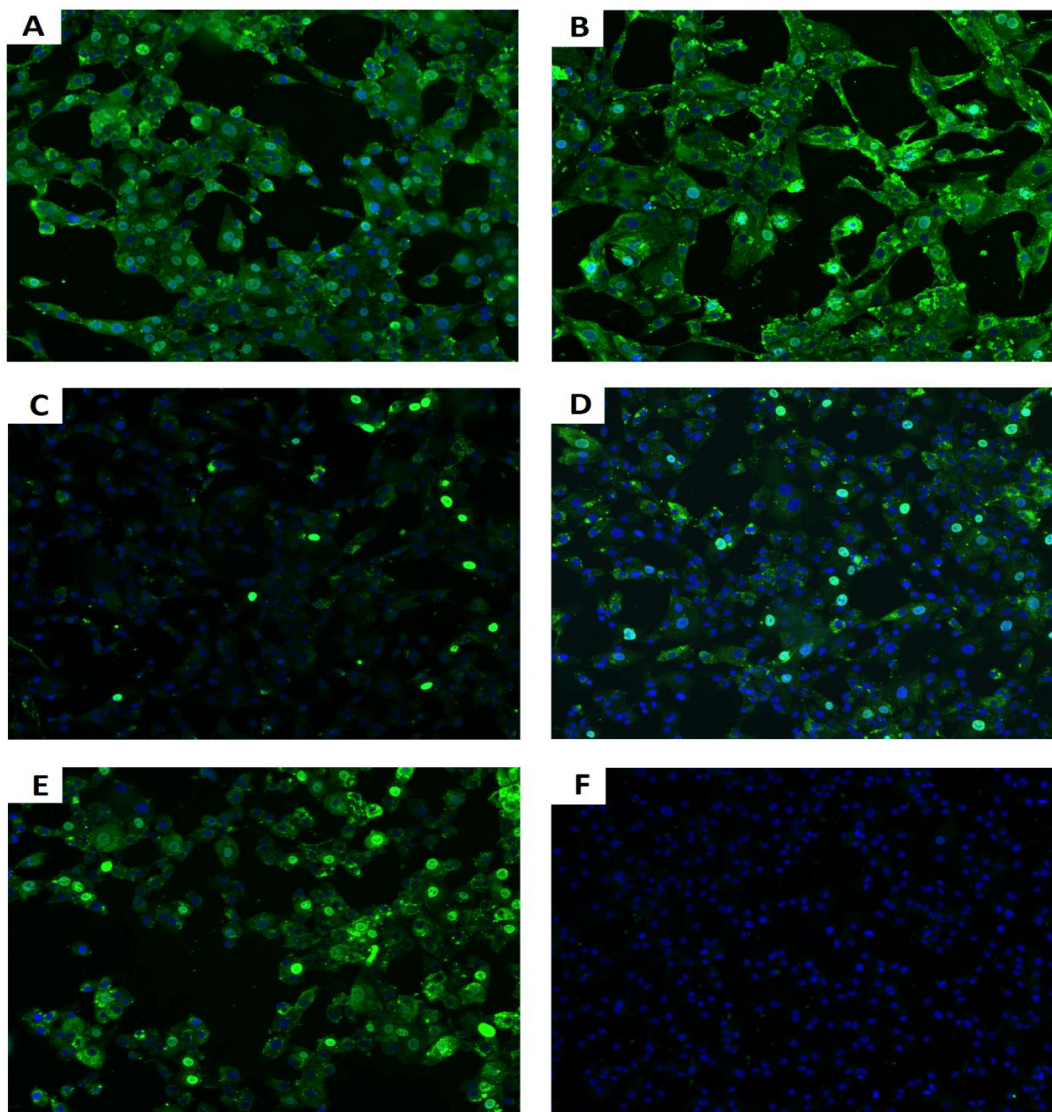
Prvním cílem této části mé práce bylo vybrat vhodná inokula pro studium BK viru a jeho interakce s pDC. Z minulých studií naší laboratoře byla vytvořena virová inokula pomocí transfekce BKV DNA do různých buněčných linií. Konkrétně se jedná o inokula z buněk Huki, Vero a HRPTEC. Přítomnost viru byla testována pomocí PCR s amplifikací úseku genu pro hlavní kapsidový protein VP1 o velikost 1061 bp. Virus bylo možné detekovat v inokulu z buněk Huki, Vero i HRPTEC, přičemž u dvou inokul z buněk Vero a HRPTEC nedošlo k amplifikaci testovaného úseku (Obrázek 18). Jejich infektivita však byla v dalším experimentu potvrzena.



Obrázek 18 Elektroforetická separace amplifikovaného DNA úseku kódujícího kapsidový protein VP1. Templátem je BK virová DNA přítomná ve virových inoulech. **M)** Marker velikosti DNA fragmentů; **1)** Huki 13 dní po transfekci (dpt); **2)** Vero 29 dpt; **3)** Vero 36 dpt; **4)** a **5)** HRPTEC 7 dpi; **6)** Plazmid obsahující sekvenci VP1 BK viru; **7)** Negativní kontrola.

Jelikož inokulum může obsahovat defektní neinfekční virus, byla infektivita BKV inokul testována na primární buněčné linii HRPTEC. Buňky byly kultivovány na podložním sklíčku do dosažení 70% konfluence a následně inkubovány s 200 μ l BKV inokula. Po 1 hodině bylo inokulum odsáto a k buňkám přidáno nové médium. Fixace paraformaldehydem byla provedena 2 dpi. Buňky byly poté imunofluorescenčně značeny primární protilátkou proti BKV VP1 a sekundární protilátkou konjugovanou s Alexa

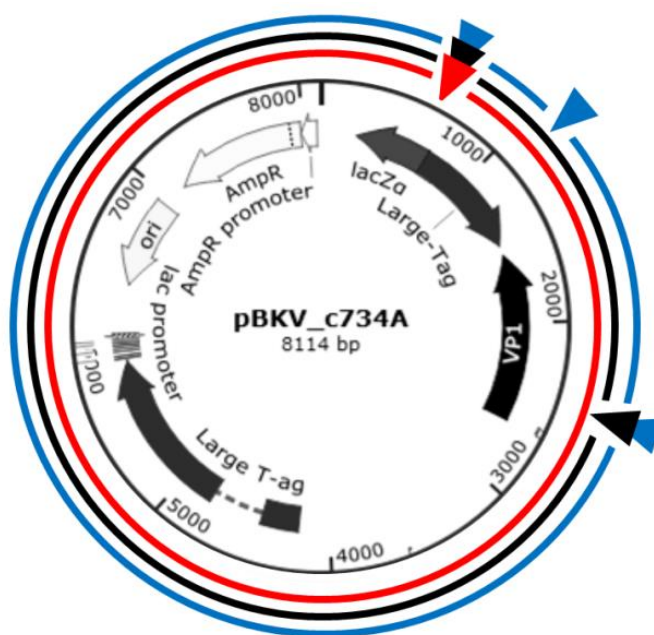
Fluor 488. Téměř 100% infekce buněk byla pozorována u inokul připravených z buněk HRPTEC a Huki (Obrázek 19A,B,E). Při použití BKV inokul získaných transfekcí buněk Vero bylo pozorováno pouze velmi nízké procento infikovaných buněk (Obrázek 19C,D). Vzhledem k tomu, že HRPTEC jsou primární linií buněk, ve kterých se BKV replikuje a perzistuje v lidském těle, byla pro následující experimenty vybrána virová inokula připravená z těchto buněk, které vykazovaly i nejvyšší infektivitu.



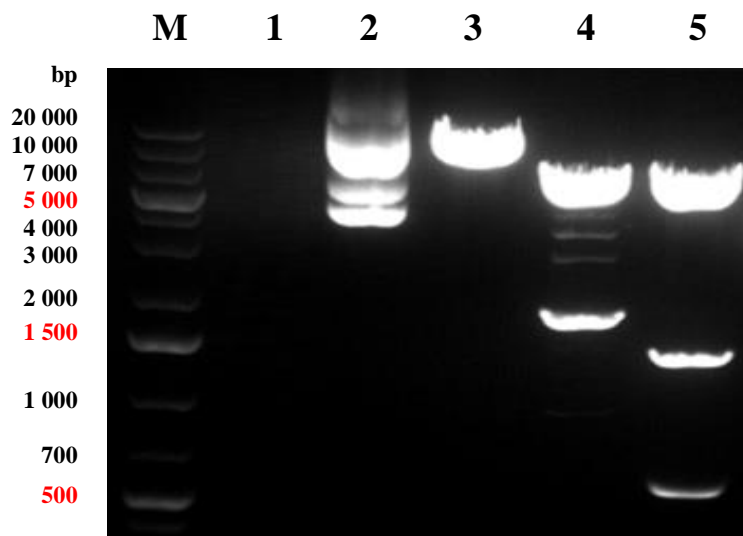
Obrázek 19 Imunofluorescenční značení infikovaných buněk HRPTEC virovými inokuly pomocí protilátky proti VP1 BKV. (A) Supernatant z infikovaných HRPTEC buněk 7 dpi; (B) Supernatant a buněčný obsah z infikovaných HRPTEC buněk 7 dpi; (C) Supernatant z virem transfekovaných Vero buněk 29 dpt; (D) Supernatant a buněčný obsah z virem transfekovaných Vero buněk 36 dpt; (E) Supernatant z virem transfekovaných Huki buněk 13dpt; (F) Neinfikované buňky jako negativní kontrola protilátky. Zvětšení snímku je 100x.

U vybraných inokul bylo potřeba dále určit množství viru, konkrétně množství přítomných genomových ekvivalentů metodou kvantitativní PCR. Pro tuto metodu bylo třeba připravit vhodné množství standardu, konkrétně plazmid pBKV_c734A, nesoucí sekvenci VP1 BK viru. Tento plazmid byl již dříve připraven v naší laboratoři. Plazmid byl elektroporován do bakterií a po namnožení byl z vybraných bakteriálních kolonií vyizolován.

Plazmid z bakteriální kolonie č.3 byl podroben restričnímu štěpení. Byly vybrány celkem tři endonukleázy. Pouze v místě 698 štěpící endonukleáza SmaI, dále BamH1 štěpící plazmid v místech 690 a 4097 a třikrát štěpící XbaI na místě 677, 4031 a 5382 (Obrázek 20). Štěpením endonukleázou SmaI došlo k linearizaci plazmidové DNA a tím i její lokalizaci na jediném místě odpovídající velikosti 8114 bp. Vypočtené velikosti fragmentů vzniklých štěpením plazmidové DNA pomocí BamH1 a XbaI odpovídaly jejich lokalizaci po elektroforetické separaci. Vyizolovaný plazmid z narostlých bakteriálních kolonií tak byl ověřen pomocí restričního štěpení (Obrázek 21).



Obrázek 20 Znáznornění míst štěpení třemi odlišnými endonukleázami na plazmidu s integrovanou sekvencí VP1 BK viru, LT proteinu a ampicilinovou rezistencí. Červeně je znázorněna endonukleáza SmaI linearizující plazmid. Černě jsou znázorněna dvě štěpící místa pro endonukleázu BamH1 na dva fragmenty. Modře jsou znázorněna tři místa štěpení endonukleázou XbaI.

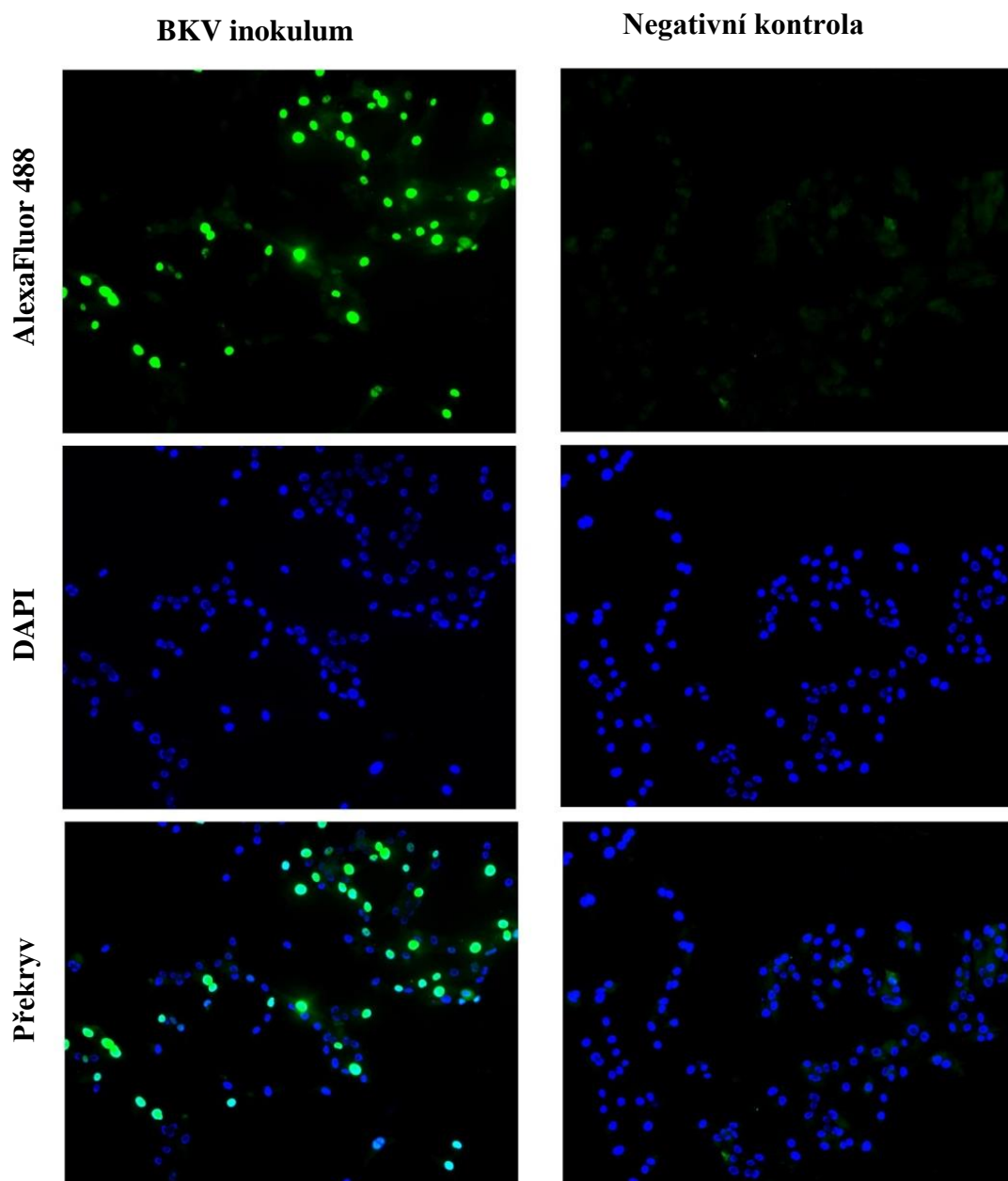


Obrázek 21 Elektroforetická separace vzniklých DNA fragmentů po restrikním štěpení. **(M)** Marker velikosti DNA fragmentů; **(1)** Negativní kontrola bez přidané DNA; **(2)** Neštěpená DNA, u které lze rozlišit odlišné konformace ; **(3)** Štěpení pomocí SmaI na jeden lieární 8114bp velký fragment; **(4)** Štěpení pomocí BamHI na dva fragmenty o velikosti 6344 bp a 1770 bp (lze vidět i mírné nespecifity štěpení); **(5)** Tři fragmenty o velikosti 6266 bp, 1351 bp a 479 bp vzniklé po štěpení XbaI.

Pro potřeby kvantifikace BK virové DNA v inokulu připraveného z buněk HRPTEC byla z připravené ředící řady plazmidové DNA sestavena standardní křivka, následně použitá pro výpočet BKV genomových ekvivalentů (GE) pomocí absolutní kvantifikace metodou kvantitativní PCR. Testované virové inokulum bylo naředěno 1x, 10x a 100x a pro kvatifikaci bylo použito ředění 100x, jelikož neředěné inokulum vykazovalo nepřesnou kvantifikaci z důvodu nízké efektivity PCR reakce. Po přepočtu koncentrací pomocí standardu bylo množství GE v BKV inokulu stanoveno na hodnotu $6,6 \times 10^{11}$ kopií/ml.

Jelikož množství GE přímo neodpovídá množství infekčního viru, byl pro inokulum určen i infekční titr metodou nepřímé imUnofluorescence. Inokulum bylo naředěno v koncentracích 1x, 10x, 100x, 1 000x a 10 000x. Poté byly narostlé buňky HRPTEC 1 hodinu inkubovány s 200 μ l naředěného inokula. Inokulum bylo následně odsáto, nahrazeno čerstvým médiem a buňky ponechány 2 dny v termostatu při 37°C. Použitá myši protilátka původně připravená proti LT antigenu viru SV40 reaguje díky vysoké homologii je i s LT BK viru. Jako sekundární protilátka byla použita oslí protilátka s kojogovanou AlexaFluor488. Infikované buňky tak lze snadno rozlišit na základě

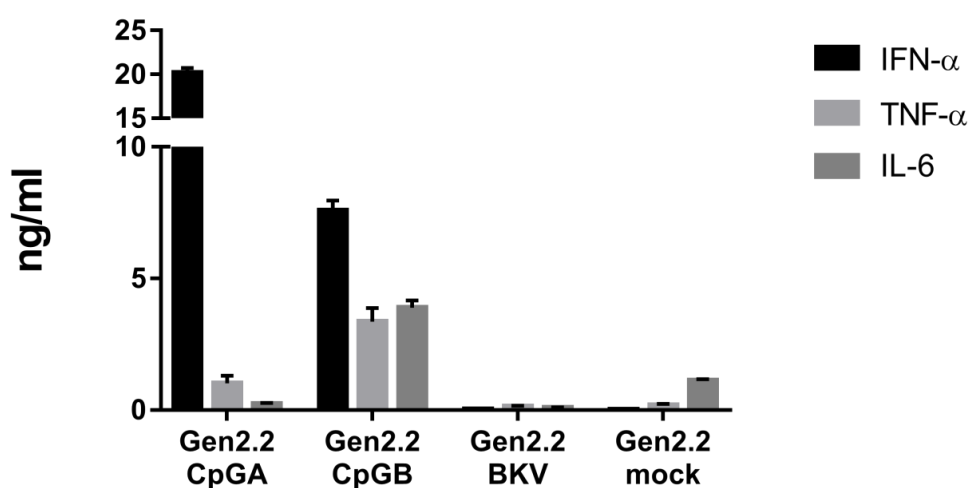
imunofluorescence jader (Obrázek 22). Imunofluorescenční titr byl stanoven na hodnotu $1,6 \times 10^6$ FFU/ml při ředění 100x, kdy bylo dosaženo infekce přibližně 38.5% buněk.



Obrázek 22 Určení imunofluorescenčního titru BKV inokula pomocí protilátky proti LT BKV s konjugovanou AlexaFluor 488. Celkový počet jader je detekován pomocí DAPI. Reprezentativní snímek ukazuje počet infikovaných a celkový počet buněk. **Vlevo)** Buňky HRPTEC infikované BKV inokulem při ředění 100x. **Vpravo)** Srovnání s neinfikovanými kontrolními buňkami HRPTEC. Zvětšení snímků je 100x.

5.2.2 Schopnost BK viru aktivovat pDC

BKV inokulum bylo následně použito pro pokusy s buňkami Gen2.2. Pro zodpovězení otázky, zdali je BK virus obdobně rozpoznán jako HSV-1 a HCMV (Obrázek 17, kapitola 5.1.2), byla linie Gen2.2 stimulována 20 μ l BKV inokula po dobu 24 hodin, což odpovídá $1,3 \times 10^5$ GE na buňku. U buněk Gen2.2 stimulovaných BKV inokulem nedošlo k indukci produkce IFN- α ani prozánětlivého TNF- α (Obrázek 23). Těž v tomto experimentu nebyla naměřena stimulace IL-6 u Gen2.2 s BKV inokulem. IL-6 je však růstovým faktorem a nachází se v kontrole BKV inokula, která byla připravena kóultivací neinfikovaných buněk HRPTEC po dobu 7 dní (mock). Další pokusy jsou proto nutné k objasnění regulace produkce IL-6 u buněk Gen2.2 stimulovaných BK virem.

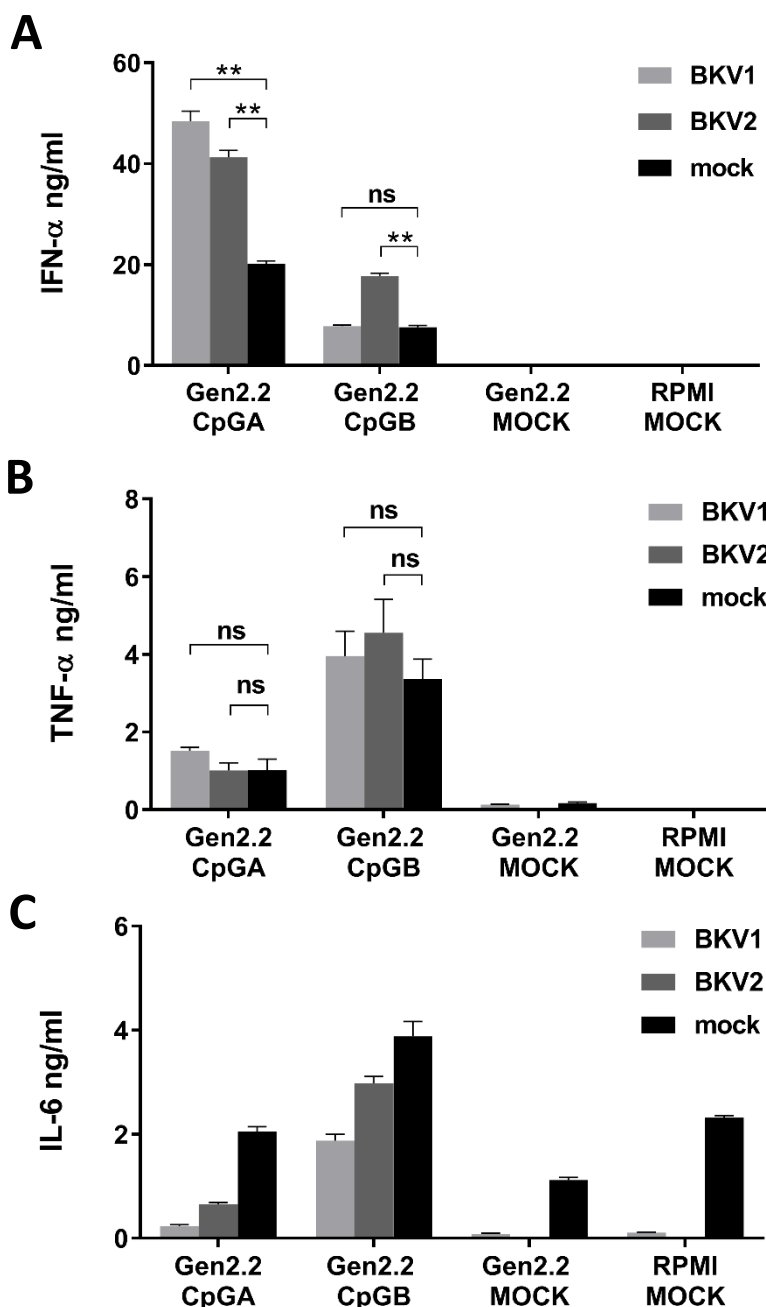


Obrázek 23 Produkce antivirového IFN- α a prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL-6 po stimulaci buněk Gen2.2 BK virovým inokulem (BKV) v porovnání se syntetickými ligandy TLR9 CpGA a CpGB. Mock reprezentuje médium bez viru.

5.2.3 Vliv BK viru na aktivované Gen2.2 a PBMC

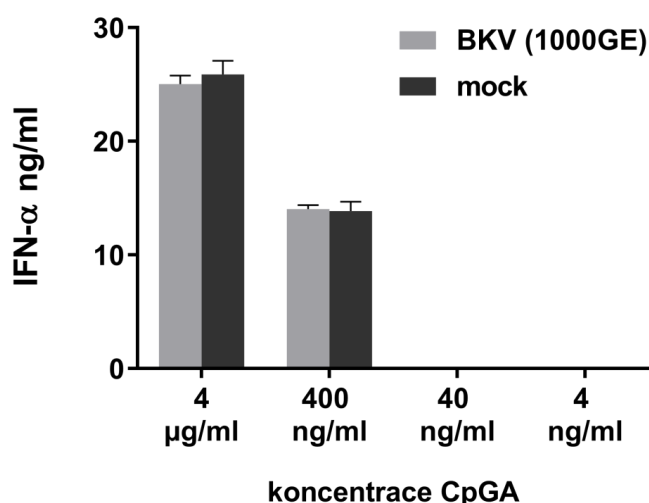
Kromě testování indukce produkce cytokinů BK virem, byla testována i jejich možná interakce s regulačními receptory a následná inhibice produkce IFN- α u aktivovaných buněk Gen2.2. Gen2.2 linie byla inkubována hodinu s 5 μ l dvou virových inokul (BKV1 – $5,3 \times 10^5$ GE, BKV2 – 2×10^4) a následně stimulována syntetickými ligandy TLR9 po dobu 24 hodin. Výsledky ukazují, po stimulaci buněk Gen2.2 pomocí CpGA dochází k výrazně vyšší produkci IFN- α u vzorků s oběma BKV inokuly oproti kontrole bez viru (mock). Pouze u jednoho inokula byla produkce zvýšena i po stimulaci CpGB (Obrázek 24A). TNF- α je mírně zvýšený u obou typů stimulů avšak bez statistické

signifikance (Obrázek 24A,B). Z výsledků lze také soudit, že BKV nedisponuje schopností blokovat TLR9 mediovanou produkci IFN- α a TNF- α . U produkce IL-6 nelze posoudit inhibiční nebo aktivační efekt vzhledem k jeho vysokému množství v mock kontrole (Obrázek 24C).



Obrázek 24 Vliv BKV inokul na produkci cytokinů (A) IFN- α (B) TNF- α a (C) IL-6 v buňkách Gen2.2 aktivovaných pomocí CpGA a CpGB. Kontrolou těchto ligandů je MOCK. RPMI reprezentuje experiment bez přítomných buněk Gen2.2 jako kontrola množství cytokinu v inokulu. \pm SEM, N=6, **, $p < 0.01$, oboustranný Mann-Whitneyův test, ns – není signifikantní.

Vzhledem k faktu, že Gen2.2 linie vykazuje signální odlišnosti od primárních pDC, byl efekt BK viru testován i na primárních pDC obsažených v PBMC. PBMC byly stimulovány klesající koncentrací CpGA spolu s 1000 GE BK viru (izolovaný centrifugací přes CsCl gradient). Koncentrace CpGA běžně používaná ke stimulaci TLR9 v buňkách Gen2.2 je 4 $\mu\text{g/ml}$, přičemž 400 ng/ml je již dostačující ke stimulaci. CpGA koncentrace 40 ng/ml a 4 ng/ml neindukují žádnou tvorbu IFN- α . Při těchto nízkých koncentracích CpGA nebyla pozorována žádná stimulace BK virem, což značí, že pDC nejsou oproti HSV-1 a HCMV schopny přímo rozpoznat tento DNA virus. Vysoké koncentrace CpGA též neukazují žádnou BKV zprostředkovanou inhibici produkce IFN- α . Oproti stimulaci buněk Gen2.2 spolu s BKV inokulem také nedochází k potenciaci produkce IFN- α . Výsledky tohoto experimentu tedy ukazují, že BK virus izolovaný pomocí centrifugace v CsCl gradientu nemá aktivační ani inhibiční účinek na produkci IFN- α u neaktivovaných a aktivovaných PBMC pomocí CpGA (Obrázek 25).

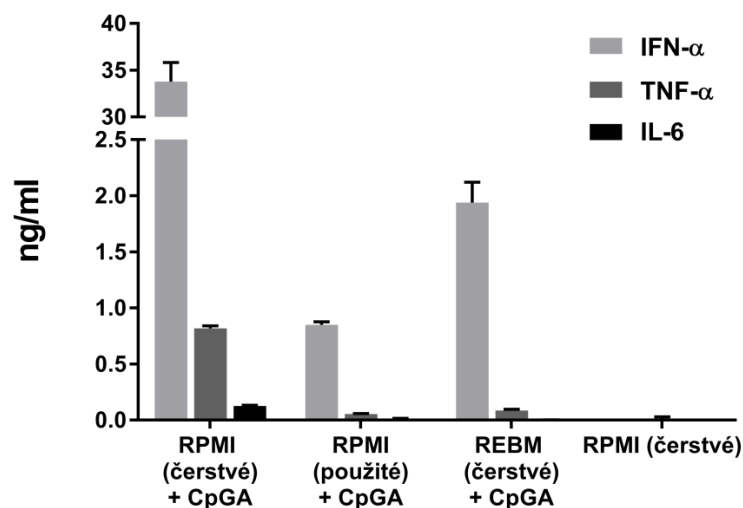


Obrázek 25 Vliv BK viru (1000 GE na buňku) na PBMC stimulované klesající koncentrací CpGA.

5.2.4 Detekce BKV infikovaných HRPTEC

Po zjištění, že BK virové částice nejsou přímo rozpoznávány primárními pDC, bylo třeba objasnit i možnost detekce BKV infikovaných buněk HRPTEC. Z tohoto důvodu byla zvolena metodika kokultivace BKV infikovaných buněk HRPTEC spolu s pDC linií Gen2.2. Jelikož HRPTEC potřebují pro růst speciální REBM médium, bylo prvně třeba určit, zdali jsou buňky Gen2.2. schopné produkovat IFN- α v tomto médiu.

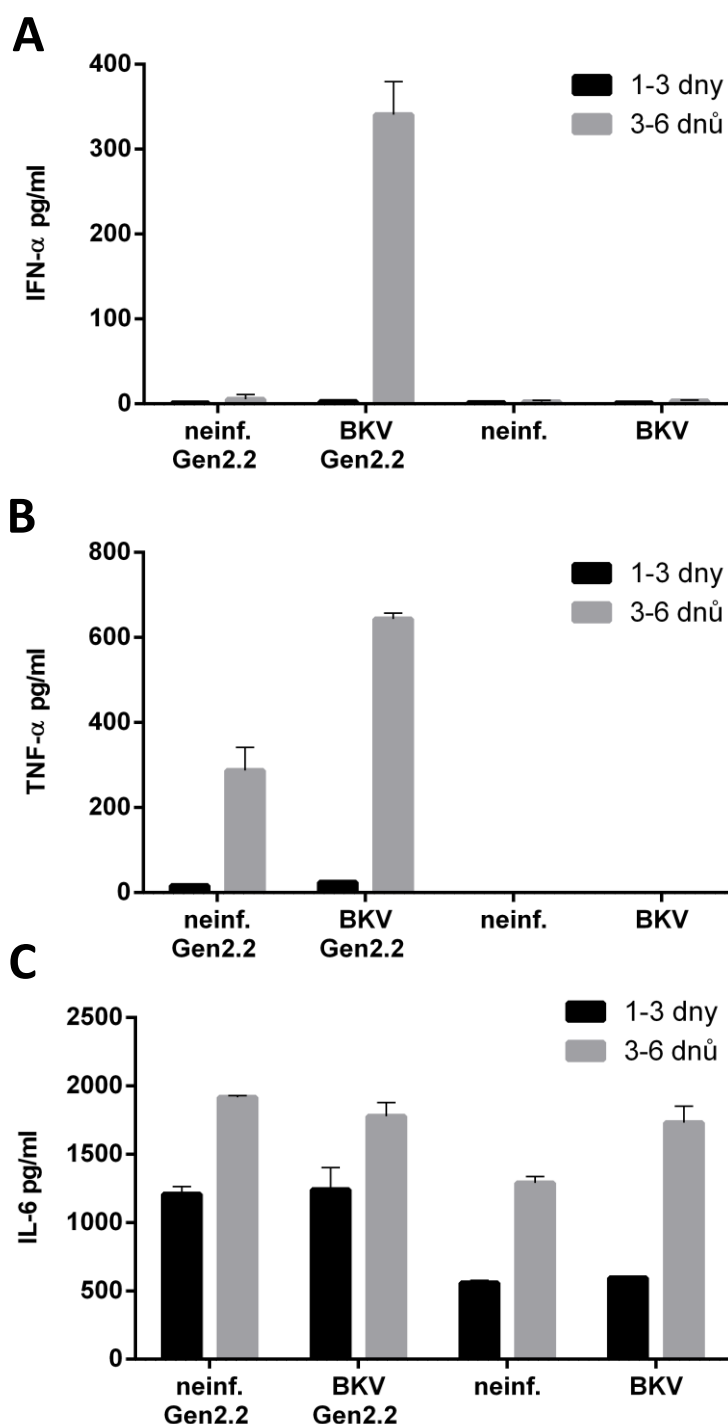
Bylo zjištěno, že po 24 hodinové stimulaci buněk Gen2.2 pomocí CpGA dochází k výrazně nižší produkci IFN- α a TNF- α v čerstvém REBM médiu vhodném pro kultivaci buněk HRPTEC v porovnání s čerstvým RPMI kultivačním médiem používaným pro buňky Gen2.2. Obdobně malou produkci lze pozorovat v případě, že jsou buňky Gen2.2 stimulovány v RPMI médiu, ve kterém byly kultivovány po dobu 2 dnů společně s buněčnou linií MS5 (Obrázek 26).



Obrázek 26 Porovnání produkce cytokinů po CpGA stimulaci buněk Gen2.2 v kultivačním médiu pro buňky Gen2.2 (RPMI) a buňky HRPTEC (REBM) pro následné účely kokultivace.

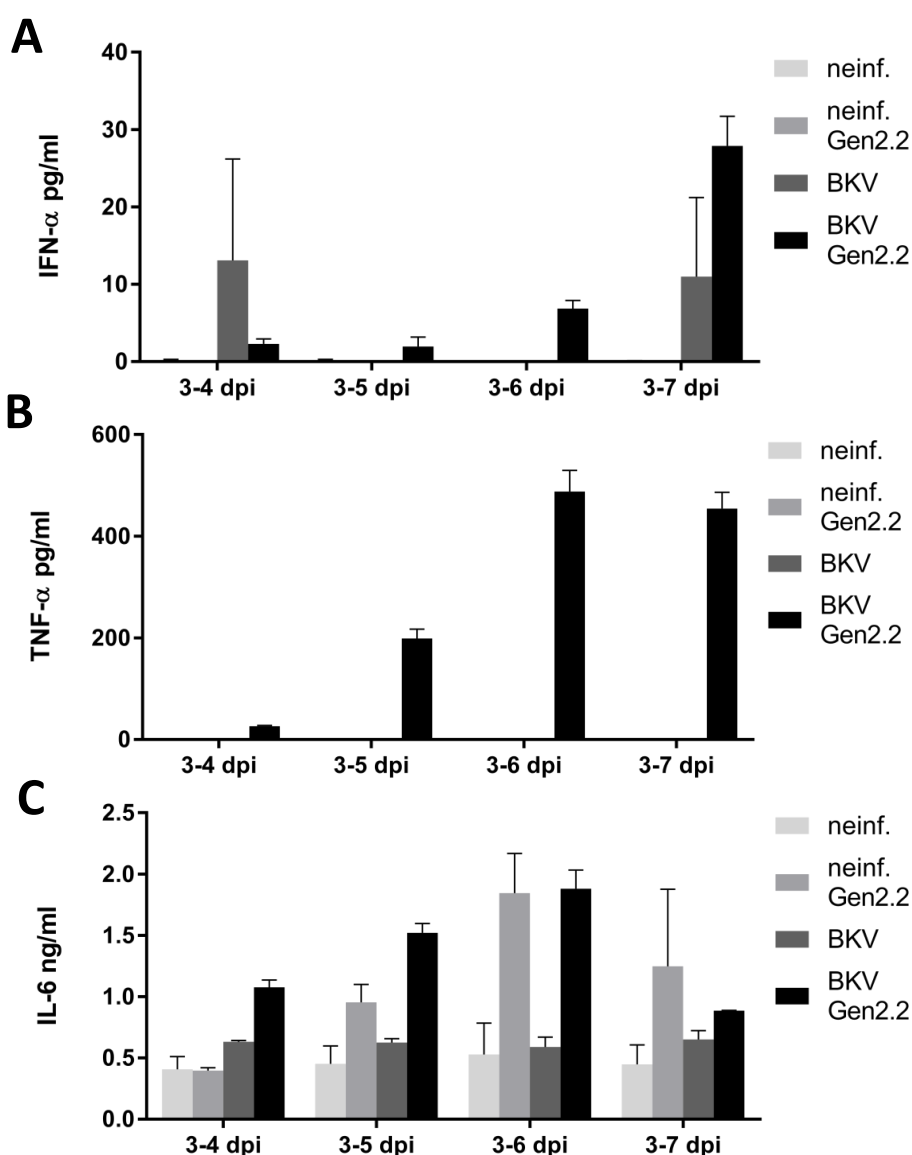
Následně byly buňky HRPTEC ponechány narůst do 70% konfluence a pro dosažení infekce 100 % buněk byly poté hodinu inkubovány s 200 μ l virového inokula, odpovídající $1,3 \times 10^6$ GE na buňku. Po inkubaci byl virus odsát a k infikovaným buňkám byla v různých časech přidána suspenzní linie buněk Gen2.2. Kokultivace probíhala v 24 jamkové destičce v objemu 1ml a koncentraci 10^6 /ml buněk Gen2.2. Kokultivace probíhala celkem tři dny ve dvou časových intervalech po infekci buněk HRPTEC BK virem. První tři dny kokultivace (1-3 dpi) buněk Gen2.2 s BKV infikovanými buňkami HRPTEC nebyla detekována produkce IFN- α a pouze velmi malá produkce TNF- α (Obrázek 27A,B). Ve druhém časovém úseku kokultivace (3-6 dpi) došlo k produkci IFN- α pouze u BKV infikovaných buněk HRPTEC kokultivovaných s buňkami Gen2.2 (Obrázek 27A). Spolu s IFN- α došlo k produkci většího množství TNF- α oproti kokultivaci buněk Gen2.2 s neinfikovanými buňkami HRPTEC (Obrázek 27B). U samotných BK infikovaných buněk HRPTEC nebyla detekována produkce IFN- α ani

TNF- α . IL-6 je přítomen již od počátku experimentu a jeho hladina stoupá jak v infikovaných, tak v neinfikovaných buňkách (Obrázek 27C). Kultivace samotných buněk Gen2.2 s BKV inokulem (MOI 10) po dobu tří dní nevyústila v produkci IFN- α a TNF- α (data nezveřejněna).



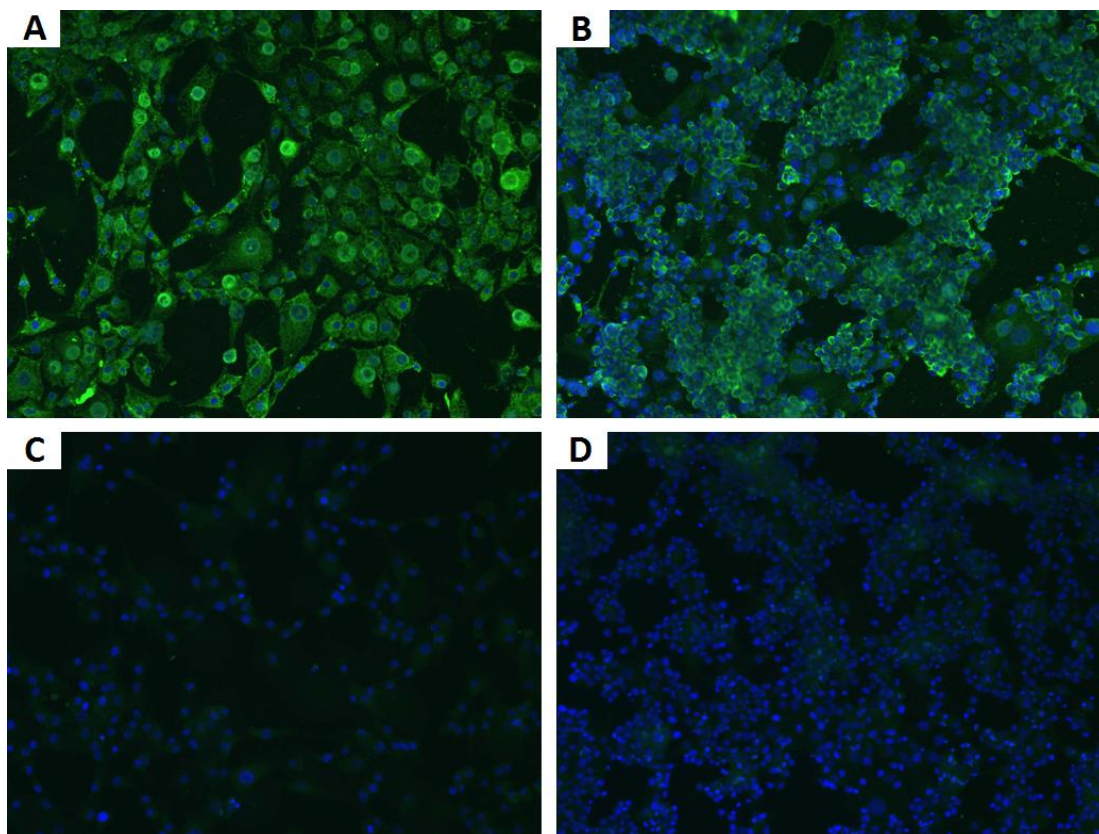
Obrázek 27 Produkce (A) IFN- α (B) TNF- α a (C) IL-6 při kokultivaci buněk Gen2.2 s BKV infikovanými a neinfikovanými HRPTEC (BKV/neinf.) ve dvou časových intervalech po dobu tří dní. \pm SEM, N=2

Pro určení kinetiky produkce cytokinů byly ve 24 jamkové destičce kokultivovány buňky Gen2.2 s BKV infikovanými buňkami HRPTEC a v jednodenních časových rozestupech bylo odebíráno 100 μ l vzorku supernatantů. Vzorky byly zbaveny buněk Gen2.2 a buňky spolu čerstvými 100 μ l média navraceny do jamky. Po analýze cytokinů byla zjištěna postupně zvyšující se koncentrace TNF- α a IL-6 (Obrázek 28B,C), avšak množství detekovaného IFN- α bylo v porovnání s TNF- α a IL-6 velmi nízké (Obrázek 28A). Tento výsledek poukazuje na fakt, že detekce viru v infikovaných buňkách by mohla být zrostředkována dlouhodobým buněčným kontaktem, který mohl být v důsledku odběru supernatantu částečně zrušen.



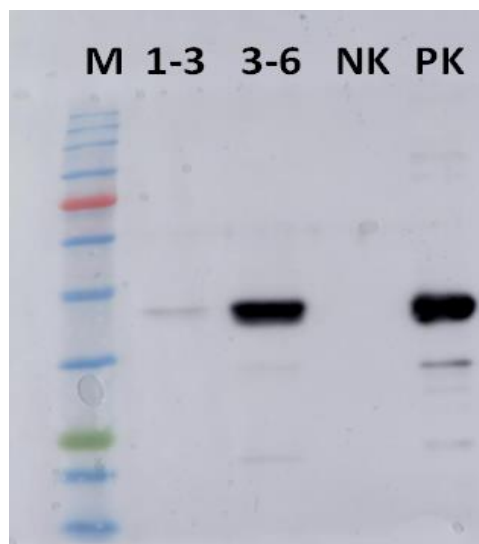
Obrázek 28 Kinetika produkce (A) IFN- α (B) TNF- α a (C) IL-6 při kokultivaci BKV infikovaných a neinfikovaných buněk HRPTEC (BKV/neinf.) spolu s buňkami Gen2.2.

Buňky HRPTEC byly kokultivovány na podložním sklíčku ve 24 jamkové destičce a následně 1 hodinu inkubovány s 200 μ l ($1,3 \times 10^6$ GE) BKV inokula. Inokulum bylo odsáto a s čerstvým médiem byly buňky HRPTEC kultivovány 3 dny v termostatu. Následně byla k buňkám 3 dpi přidána buněčná linie Gen2.2 a spolu kokultivována další 3 dny. Buněčný kontakt byl následně pozorován imunofluorescenčním značením BKV proteinu VP1. Gen2.2 buněčná linie se ukazuje být těsně přichycena k povrchu BKV infikovaných i neinfikovaných HRPTEC (Obrázek 29B,D).



Obrázek 29 Imunofluorescenční značení VP1 BKV při kokultivaci buněk HRPTEC s buňkami Gen2.2. **A)** BKV infikované buňky HRPTEC; **B)** Kokultivace BKV infikovaných buněk HRPTEC s buňkami Gen2.2; **C)** Neinfikované buňky HRPTEC; **D)** Kokultivace neinfikovaných buněk HRPTEC s buňkami Gen2.2.

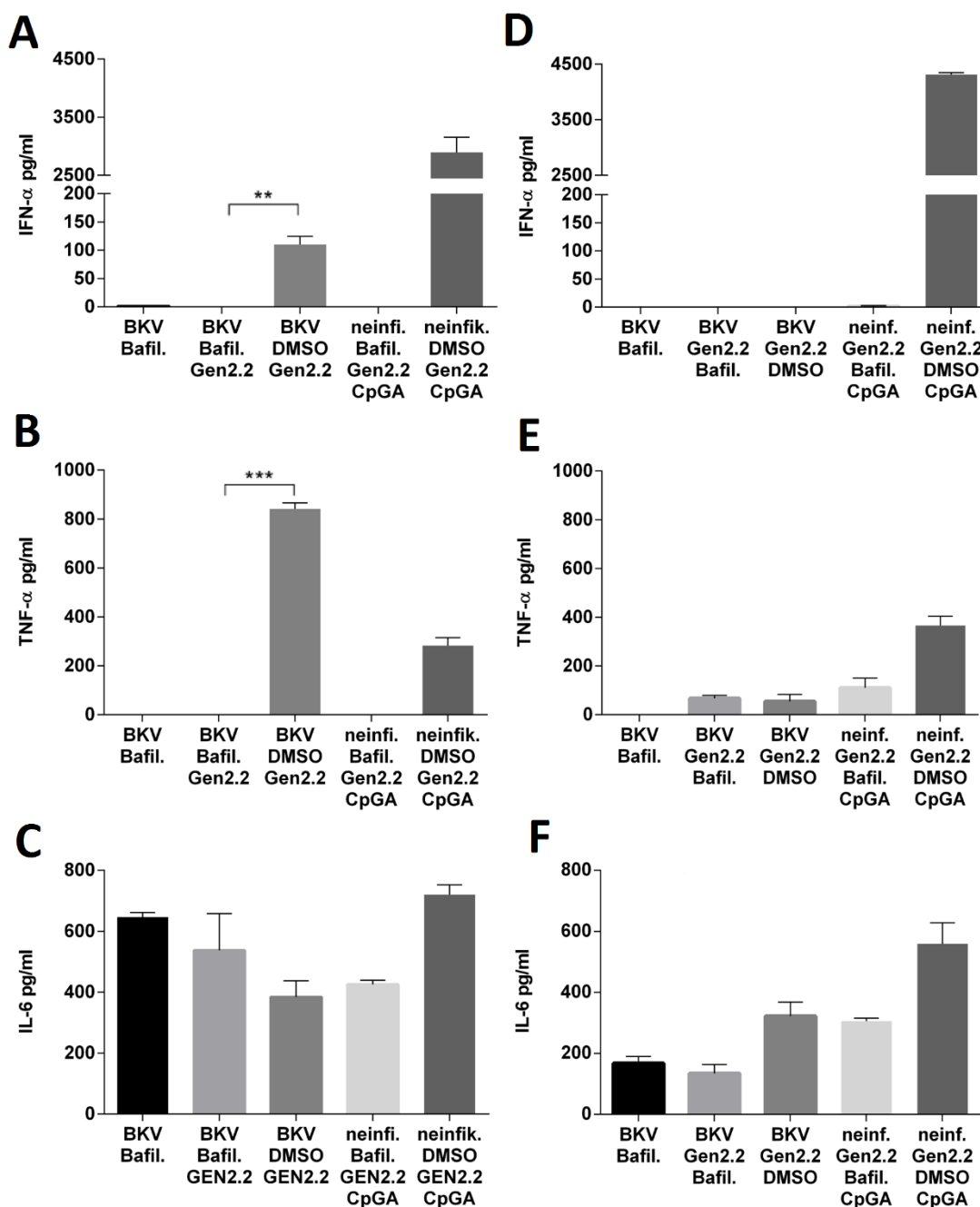
V časových intervalech vybraných pro kokultivaci bylo také sledováno množství produkovaného VP1 v BKV infikovaných buňkách HRPTEC. První tři dny po infekci buněk HRPTEC BK virem nedochází k vysoké produkci VP1. Nárůst produkce je zaznamenán až v pozdních fázích infekce, což odpovídá rozmezí 3-6. dne (Obrázek 30), který je zároveň důležitý pro tvorbu cytokinů při kokultivaci buněk Gen2.2 s BKV infikovanými buňkami HRPTEC.



Obrázek 30 Produkce kapsidového VP1 proteinu v BKV infikovaných HRPTEC v prvních třech dnech po infekci (**1-3**) a následujících třech dnech po infekci (**3-6**). **NK** – neinfikované HRPTEC jako negativní kontrola, **PK** –BK virus jako pozitivní kontrola, **M** – marker.

5.2.5 Použití inhibitorů endozomální acidifikace

Pro zjištění role endosomálních TLR receptorů bylo následně užito Bafilomycinu, inhibitoru V-ATPázové protonové pumpy. Použití Bafilomycinu má za následek inhibici acidifikace endosomálního prostředí a tím i atenuaci TLR signalizace. Kokultivace buněk Gen2.2 s BKV infikovanými buňkami HRPTEC za přítomnosti Bafilomycinu vedla k atenuaci produkce IFN- α a TNF- α (Obrázek 31A,B), přičemž hladina IL-6 zůstala nezměněna (Obrázek 31C). Tento efekt však lze pozorovat pouze u kokultivace, kdy bylo dosaženo 100% infekce buněk HRPTEC (Obrázek 31A,B,C). Při 30% infekci buněk HRPTEC nejsou buňky Gen2.2 pravděpodobně schopny detekce infikovaných buněk a produkci IFN- α (Obrázek 31D). Dochází i k výraznému poklesu v produkci TNF- α a IL-6 (Obrázek 31E,F). Tyto výsledky naznačují, že při kokultivaci buněk Gen2.2 s BKV infikovanými buňkami HRPTEC je detekce BKV závislá na TLR přítomných v endosomálních kompartmentech. Výsledky také napovídají tomu, že buňky Gen2.2 jsou schopny zdárné detekce BKV pouze při infekci 100% buněk HRPTEC.

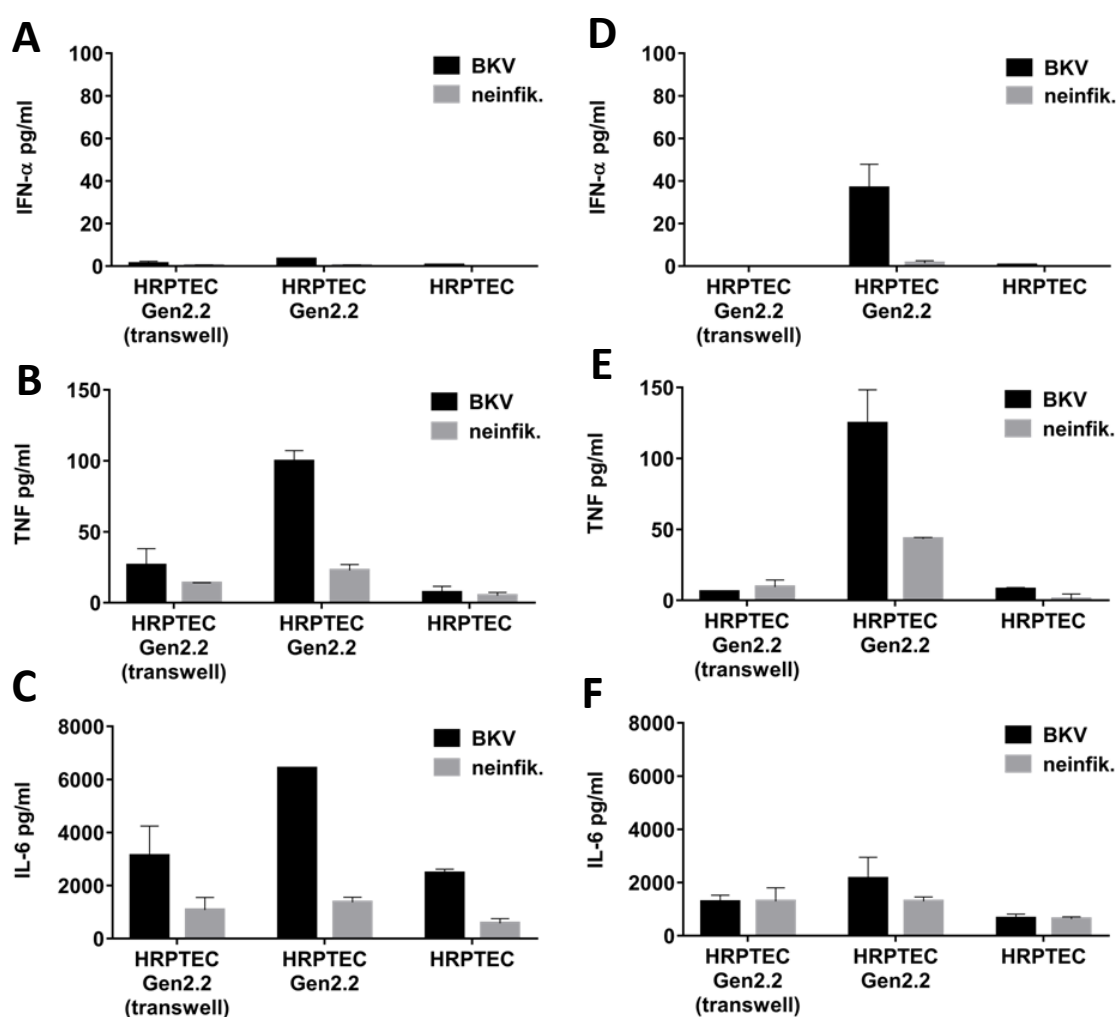


Obrázek 31 Vliv Bafilomycinu (Bafil.) na produkci IFN- α , TNF- α a IL-6 při kokultivaci buněk Gen2.2 s BKV infikovanými a neinfikovanými buňkami HRPTEC (BKV/neinf) (A,B,C) Detekce BKV a efekt Bafilomycinu při infekci 100% buněk HRPTEC. (D,E,F) Stejný experiment při 30% infekci buněk HRPTEC. DMSO – kontrola k Bafilomycinu, CpGA – agonista TLR9 jako kontrola funkčnosti Bafilomycinu. \pm SEM, N=3, **, p <0.01, ***, p <0.001 oboustranný Studentův test

5.2.6 Použití transwellové komůrky

Následně byla zkoumána závislost detekce BKV infikovaných buněk HRPTEC na těsném kontaktu s buňkami Gen2.2. Pro tento případ byly na dně jamky narostlé

adhezivní buňky HRPTEC kokultivovány s buňkami Gen2.2, avšak oddělené pomocí transwellové komůrky, která zabránila buněčnému kontaktu při kokultivaci v jedné jamce. Experiment probíhal ve dvou paralelách v objemu 500 μ l (Obrázek 32A,B,C) a 750 μ l (Obrázek 32D,E,F). Pouze při kokultivaci infikovaných buněk HRPTEC s buňkami Gen2.2 v objemu 750 μ l došlo k produkci IFN- α , které bylo zabráněno použitím transwellové komůrky (Obrázek 32B). Produkce TNF- α byla užitím transwellové komůrky snížena v obou objemech (Obrázek 32B,E). Nižší objem též vyústil k výrazně vyšší produkci IL-6 u infikovaných buněk HRPTEC. Použitím transwellové komůrky došlo u obou objemů ke snížení produkovaného IL-6 (Obrázek 32C,F).



Obrázek 32 Porovnání produkce IFN- α , TNF- α a IL-6 při oddělené kokultivaci buněk Gen2.2 s BKV infikovanými/neinfikovanými buňkami HRPTEC pomocí transwellové komůrky (transwell) s kokultivací bez transwellové komůrky a s buňkami HRPTEC bez buněk Gen2.2. (A,B,C) Kokultivace v totálním objemu 500 μ l. (D,E,F) Kokultivace v totálním objemu 750 μ l. \pm SEM, N=2

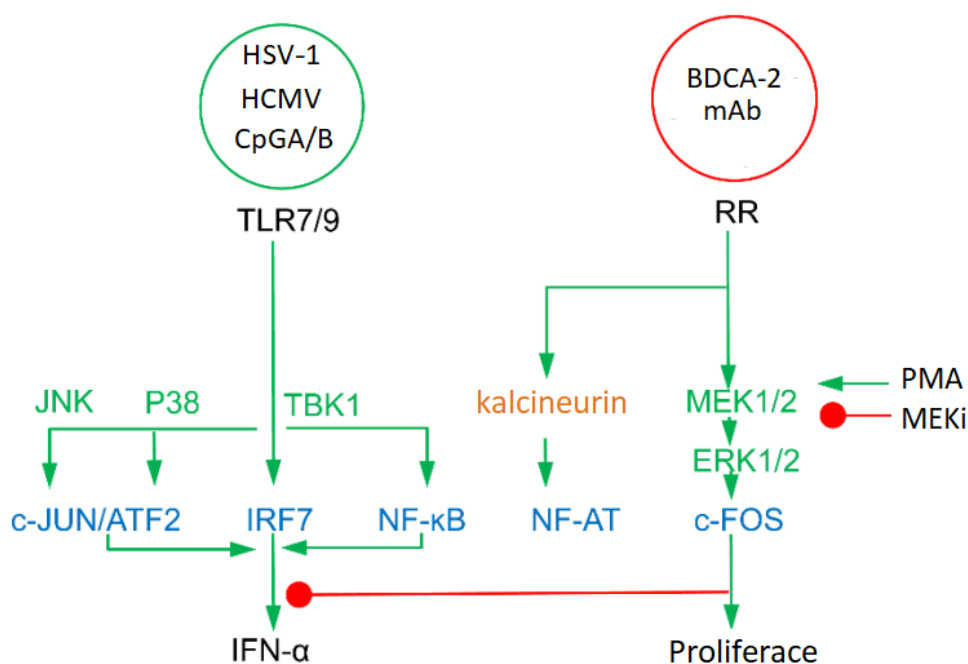
6 DISKUZE

6.1 Klíčové komponenty TLR signální kaskády u pDC

Prvním tématem této práce je studium regulace TLR9 signální dráhy vedoucí k produkci IFN- α u pDC buněčné linie Gen2.2 a primárních pDC obsažených v PBMC zdravých donorů. Spolu s antivirovým IFN- α byla zároveň zkoumána i produkce prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL-6. Pro tento účel byl vybrán panel inhibitorů signalizačních komponent hrající klíčovou roli v tvorbě AP1 (c-JUN, ATF2, c-FOS) transkripčního faktoru, NF κ B signalizaci, vápníkové signalizaci a MAP kinázové signalizaci. Dále byly pro účely stimulace použity dva ligandy stimulující TLR9, a sice CpGA a CpGB. Z vybraného panelu inhibitorů se inhibice MEK1/2 kinázy ukázala mít jako jediná potenciační efekt na produkci IFN- α po stimulaci pomocí CpGA (Obrázek 33). Spolu s IFN- α dochází i k produkci TNF- α , u které MEK1/2 inhibitor naopak produkci snižuje. U stimulace pomocí CpGB efekt MEK1/2 inhibitoru na IFN- α není tak velký jako u CpGA a role kalcineurinu v produkci IFN- α se nezdá být esenciální po stimulaci CpGB. Dále je zřejmé, že produkce TNF- α a IL-6 využívá po stimulaci CpGB stejné signalizační dráhy. Inhibice MEK1/2 kinázy nevedla ke zvýšení produkce IFN- α u PBMC stimulovaných CpGA a efekt inhibitorů je tak srovnatelný se stimulací buněk Gen2.2 pomocí CpGB. Výsledky zkoumaných inhibitorů u buněk Gen2.2 také ukazují odlišný efekt u stimulace CpGA oproti CpGB, potvrzující tak studie o rozdílném zapojení signálních drah z časného a pozdního endosomu, popřípadě z NF κ B a IRF7 endosomů pDC (Guiducci et al. 2006; Honda, Ohba, et al. 2005; Kim et al. 2014; Sasai et al. 2010).

Následující experimenty byly zaměřeny na objasnění role MEK1/2 kinázy na produkci IFN- α u buněk Gen2.2 stimulovaných pomocí CpGA. Cílená aktivace MEK1/2 pomocí PMA má za následek výraznou inhibici produkce IFN- α , přičemž užití inhibitoru MEK1/2 tuto inhibici produkce IFN- α zvrátí. Jelikož pDC na svém povrchu obsahují množství regulačních receptorů (Cao et al. 2006, 2007, 2009; Dzionek et al. 2001; Ju et al. 2016), které produkci IFN- α inhibují, byl efekt inhibitoru MEK1/2 zkoumán v souvislosti s aktivací jednoho z těchto receptorů. Vybraným regulačním receptorem byl BDCA-2, který je již popsán jako negativní regulátor produkce IFN- α (Dzionek et al. 2001). Jeho aktivace vyústí ve spuštění BCR-like dráhy, která má inhibiční účinek na produkci IFN- α . K této inhibici však nedojde v případě přítomnosti MEK1/2 inhibitoru.

Následně byl efekt inhibice MEK1/2 kinázy zkoumán u buněk Gen2.2, u kterých byla TLR9 dráha aktivována pomocí inokul virů HSV-1 a HCMV, jakožto popsáných přirozených agonistů TLR9 (Schuster et al. 2010; Varani et al. 2007b). Stimulace virovými inokuly za přítomnosti inhibitoru MEK1/2 kinázy zvýšila produkci IFN- α a potvrdila tak inhibiční roli MEK1/2 kinázy. Tyto výsledky pak jakožto součást studie (Janovec et al. 2018) ukazují, že aktivace BDCA-2 vede k aktivaci MEK1/2 kinázy, přičemž aktivace MEK1/2-ERK dráhy je pak zodpovědná za inhibici produkce IFN- α u pDC.



Obrázek 33 Zúčastněnost testovaných kináz v TLR7/9 a BCR-like (RR) signální kaskádě. Aktivační zelené a inhibiční červené šipky. Kinázy jsou značeny zeleně, transkripční faktory modře. RR – regulační receptory. (Upraveno - Janovec et.al. 2018)

6.2 Rozpoznání BK viru pDC

Pro objasnění vlivu malých DNA virů na regulaci produkce IFN- α u pDC, byl do této studie vybrán lidský BK virus. BKV je vysoce rozšířený perzistující virus, který působí klinické problémy u imunosuprimovaných pacientů. To, jakým způsobem je kontrolován imunitním systémem, nebylo doposud zcela objasněno. Tato práce se věnuje doposud nepopsanému tématu vlivu BK viru na pDC.

V této práci byl zkoumán BK virus na primární buněčné linii HRPTEC spolu s pDC buněčnou linií Gen2.2 a primárními pDC obsaženými v PBMC. Zdrojem BK viru

bylo virové inokulum, které je oproti viru vyčištěném isopyknickou centrifugací v CsCl gradientu fyziologicky blíže viru produkovanému v infikovaných pacientech. Toto inokulum může obsahovat kromě replikačně kompetentního viru i defektní částice, volnou virovou DNA nebo mimobuněčné váčky a exosomy s virovou RNA. Ty mohou být zodpovědné za detekci viru pDC, jako je tomu například u jiných virů (Décembre et al. 2014; Dreux et al. 2012; Feng et al. 2015; Wieland et al. 2014). Za účelem získu čistého viru by však tyto komponenty byly ztraceny během izolačního procesu.

Stimulace buněk Gen2.2 BK virovým inokulem neindukovala v porovnání s inokuly virů HSV-1 a HCMV žádnou produkci IFN- α . IFN- α nebyl detekován ani po stimulaci PBMC čistým virem. Spolu s IFN- α nedocházelo ani k produkci prozánětlivého TNF- α . U buněk Gen2.2 stimulovaných BKV bylo měřeno i množství IL-6, avšak vzhledem k jeho vysokému množství v mock kontrole inokula nelze posoudit jasný efekt BKV inokula na produkci IL-6 u buněk Gen2.2. Tyto výsledky tak jsou v rozporu se studií věnované indukci IFN-I a III u osob deficientních na kinázu IRAK-4, kde BKV stimuloval produkci IFN-I v pDC srovnatelné s virem HSV-1 (Yang et al. 2005).

Jelikož schopnost aktivace pDC virovými částicemi BK viru nebyla potvrzena, byl testován i vliv BK viru na aktivované pDC. Cílem tohoto pokusu bylo objasnit možnou schopnost interakce BK viru s regulačními receptory s následnou indukci inhibice produkce IFN- α , jako je tomu u HCV (Florentin et al. 2016). Pro tento případ byla linie Gen2.2 inkubována s virovým inokulem a poté aktivována syntetickými ligandy TLR9. U aktivovaných buněk Gen2.2 v přítomnosti BKV inokula nebyl detekován žádný pokles produkce IFN- α a TNF- α , naopak došlo k velmi výraznému nárůstu produkce IFN- α a mírnému nárůstu TNF- α . Narozdíl od linie Gen2.2 nedošlo k tomuto zvýšení produkce IFN- α po stimulaci PBMC čistým virem a CpGA. Tato potenciace produkce IFN- α připomíná efekt inhibitoru MEK1/2 na tvorbu IFN- α v buňkách Gen2.2 aktivovaných agonisty TLR9. Za potenciaci produkce IFN- α u buněk Gen2.2 a nikoli u PBMC může být však zodpovědná volná DNA v inokulu, případně defektní částice nebo exosomy, které nebyly přítomny u stimulace PBMC čistým virem. Můžeme také předpokládat, že stimulace buněk Gen2.2 je zodpovědná za zvýšení schopnosti detekce BK viru.

Prímé rozpoznání BKV částic však není jediný možný mechanismus, jakým je pDC schopna detekovat virus. Je známo, že například virus HIV je slabý stimulant pDC, avšak kokultivace pDC s HIV infikovanými buňkami indukuje vysokou produkci IFN- α

(Diebold et al. 2003; Lepelley et al. 2011; Schmidt et al. 2005). Podobně, zatímco virové částice HCV blokují tvorbu IFN- α v aktivovaných pDC, HCV aktivované hepatocyty vyvolávají robustní produkci IFN- α v pDC (Dreux et al. 2012; Florentin et al. 2016). Schopnost detekce viru pomocí buněk Gen2.2 tak byla zkoumána i na BKV infikovaných buňkách HRPTEC. Kokultivace buněk Gen2.2 s infikovanými buňkami HRPTEC 3-6. den po infekci vyústila v produkci IFN- α a vyššího množství TNF- α . Možným vysvětlením nízké produkce IFN- α může být do jisté míry fakt, že buňky Gen2.2 jsou schopny výrazně nižší produkce IFN- α v kultivačním médiu pro buňky HRPTEC v porovnání s produkcí v čerstvém kultivačním médiu pro buňky Gen2.2. Zde lze najít vysvětlení ve výsledcích první části této práce, jelikož médium pro buňky HRPTEC obsahuje vyšší množství růstových faktorů, které jsou schopny aktivace MEK1/2-ERK dráhy a tím produkci IFN- α inhibovat. Stejný efekt nízké produkce IFN- α lze pozorovat i u stimulace buněk Gen2.2 v použitém RPMI médiu, ve kterém byly kultivovány spolu s buňkami MS5 po dobu 2 dní.

Při kokultivaci se ukázalo, že buněčný kontakt je klíčový pro zdárnou detekci BKV infikovaných buněk HRPTEC. Produkce IFN- α nenastala u experimentu sledování kinetiky produkce IFN- α , kdy bylo kokultivovaným buňkám měněno médium každý den, v důsledku čehož se zrušil kontakt mezi buňkami (data nezveřejněna). Obdobný efekt byl pozorován i u studie, kdy kokultivace pDC a HIV infikovaných buněk probíhala na třepačce, což znemožnilo buněčný kontakt a tím i produkci IFN- α (Lepelley et al. 2011; Sourisseau et al. 2007). Tento efekt závislosti na buněčném kontaktu byl následně zkoumán užitím transwellové komůrky, která při kokultivaci oddělí buňky Gen2.2 a BKV infikované buňky HRPTEC. Kokultivace bez transwellové komůrky vyústila v produkci IFN- α a TNF- α , která však nenastala při kokultivaci s komůrkou. Roli v detekci infikovaných buněk tak může hrát tvorba cytoplazmatických můstků a přenos cytoplazmy infikovaných buněk s virovými RNA do cytoplazmy pDC. Spolu s tím však může do cytoplazmy vstoupit i zvýšené množství SOCS3, jehož exprese je zvýšena v BKV infikovaných HRPTEC. Tato zvýšená produkce SOCS3 nastává zároveň v časech, kdy u buněk Gen2.2 kokultivovaných s BKV infikovanými buňkami HRPTEC byl detekován IFN- α a mohou být zodpovědné za nízkou produkci IFN I (Assetta et al. 2016). Současně by vliv SOCS3 vysvětloval vyšší hladiny TNF- α , jelikož SOCS proteiny spíše negativně regulují JAK/STAT signalizaci, přičemž MAPK a NF κ B nejsou touto regulací výrazně zasaženy (Baetz et al. 2004). U polyomavirů byla popsána i inhibice exprese mRNA pro

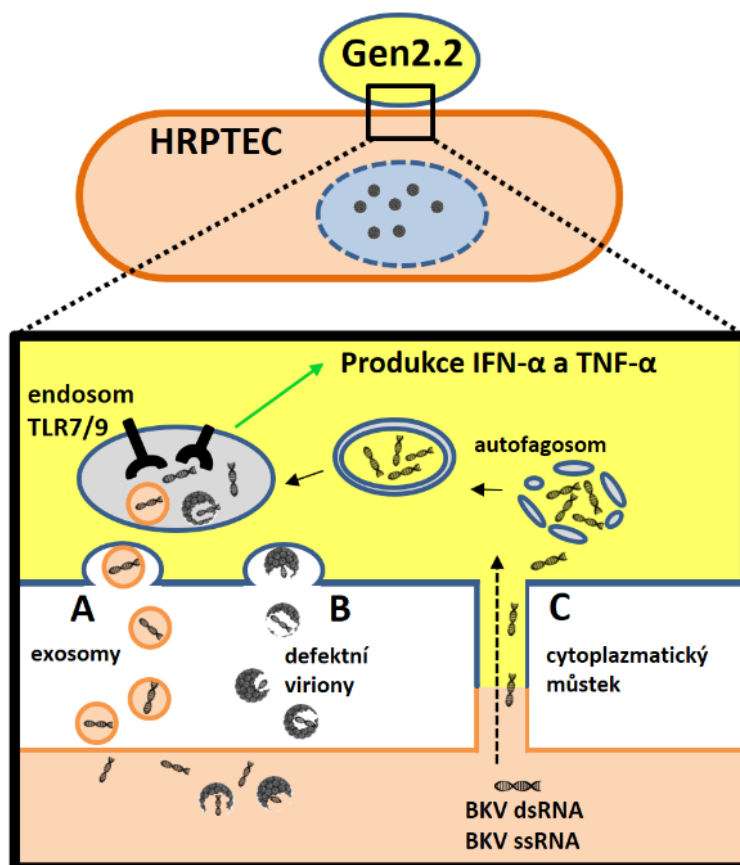
TLR9 časnými geny BKV a MCV. Mechanismus u BKV může být podobný jako u MCV, a sice snížení exprese transkripčního faktoru C/EBP β (Assetta et al. 2016), což je důležitý faktor signalizace regulující expresi TLR8 a 9 a v kooperaci s dalšími transkripčními faktory reguluje i IL-6, IL-8 a TNF- α (Li et al. 2007). Tato inhibice TLR9 by pak mohla být přenesena do pDC a blokovat produkci IFN I. Další možností je přenos ST proteinu BK viru do pDC a jeho následná interakce s PP2A. Ta hraje důležitou defosforylační roli v MEK1/2-ERK dráze, která má inhibiční vliv na produkci IFN I u pDC. Inhibice PP2A pomocí ST tak může mít za následek konstitutivně aktivní MEK1/2 kinázu inhibující produkci IFN I (Janovec et al. 2018).

Možným způsobem, popsáným u HCV, je přenos aktivačního signálu pomocí exosomů (Dreux et al. 2012). Tyto HCV exosomy působí na krátkou vzdálenost a potřebují pro aktivaci pDC těsný buněčný kontakt. Těsný kontakt pravděpodobně umožní vstup mnohem většího množství exosomů do pDC, čímž dojde k překonání určitého prahu aktivace produkce IFN- α . Již u několika virů bylo popsáno, že za detekci infikovaných buněk pomocí pDC je zodpovědný endosomální TLR (Bruni et al. 2015; Lepelley et al. 2011; Rua et al. 2012; Takahashi et al. 2010; Wieland et al. 2014). Dalším cílem tak bylo objasnit receptor zodpovědný za detekci BKV infikovaných buněk HRPTEC pomocí buněk Gen2.2. Bylo užito Bafilomycinu, inhibitoru endosomální acidifikace, který inhibuje signalizaci endosomálních TLR. Kokultivace BKV infikovaných buněk HRPTEC spolu s buňkami Gen2.2 za přítomnosti Bafilomycinu nevykazuje žádnou produkci IFN- α ani TNF- α , což značí, že za detekci BKV infikovaných buněk HRPTEC jsou pravděpodobně zodpovědné endosomální TLR7/9 buněk Gen2.2. Tyto výsledky však ještě zcela jasně nepopisují mechanismus přenosu aktivačního signálu. Kromě exosomů může být aktivační signál přenesen taktéž přes zmíněné cytoplazmatické můstky. Bafilomycin je taktéž inhibitor autofágie, která je dobře zdokumentována u pDC jakožto mechanismus detekce viru z cytoplazmy (Lee et al. 2007). Cytoplazmatická virová RNA zde tak nemusí být detekována RLR, nýbrž je zabalena do autofagosomu, který následně splyne s endosomem a umožní detekci virové RNA pomocí TLR (Obrázek 34).

V detekci viru se též ukázala důležitá role objemu media, ve kterém jsou buňky kokultivovány, a také množství infikovaných buněk. Tyto podmínky pak mají ve výsledku odlišný vliv na produkci antivirových a prozánětlivých cytokinů. V malém objemu nedocházelo k produkci IFN- α . Možným vysvětlením je vyšší koncentrace

růstových faktorů, které spouští MEK1/2-ERK dráhu a inhibují produkci cytokinů. U 30% infekce buněk HRPTEC je produkce IFN- α a TNF- α také snížena.

U pacientů po transplantaci orgánu hrají pDC významnou roli coby antigen prezentující buňky aktivující cytotoxické T-lymfocyty. Vzhledem k vyšší produkci prozánětlivých cytokinů můžeme předpokládat i jejich významnou roli v tvorbě zánětlivého prostředí po reaktivaci BKV, což ještě více přispívá odhojení transplantovaného orgánu. Objasnění klíčových signalizačních komponent, mechanismu zodpovědného za tuto produkci cytokinů a taktéž mechanismu regulačních receptorů u pDC tak může mít významný klinický dopad na léčbu a zabránění reaktivace perzistujících virů po imunosupresi. Dalším důležitým cílem je léčba chronických virových onemocnění, u kterých virus skrze regulační receptory navozuje u pDC imunotoleranci, případně i léčba autoimunitních chorob.



Obrázek 34 Možné způsoby přenosu aktivačního signálu z BKV infikovaných buněk HRPTEC do endosomálního kompartmentu s TLR7/9 u buněk Gen2.2. (A) Detekce exosomů s BK virovou nukleovou kyselinou. (B) Detekce defektních BKV částic. (C) Přenos BK virových RNA do cytoplazmy Gen2.2 přes cytoplazmatické můstky, jejich zabalení do autofagosomu.

7 SOUHRN

První část práce je zaměřena na studium signalizce TLR9 dráhy zodpovědné za produkci IFN- α . Virus zde byl nahrazen syntetickými agonisty TLR9 a inhibiční vliv virů zde byl reprezentován aktivací receptoru BDCA-2 monoklonální protilátkou.

Výstupem první části této diplomové práce jsou poznatky v regulaci interferonové odpovědi u pDC.

- * inhibice MEK1/2 kinázy vede k upregulaci produkce IFN- α u buněk Gen2.2
- * aktivace MEK1/2 kinázy vyústi v inhibici produkce IFN- α u aktivovaných buněk Gen2.2
- * MEK1/2 je součástí BCR-like signální kaskády, jelikož stimulace BDCA-2 u aktivovaných buněk Gen2.2 za přítomnosti MEK1/2 inhibitoru nevede k inhibici produkce IFN- α

Druhá část práce byla zaměřena na BK virus a jeho nepopsaný vliv na pDC. Cílem bylo potvrdit hypotézu, že BK polyomavirus je rozpoznáván imunitními buňkami pDC.

- * BK virus není přímo rozpoznáván pDC linií Gen2.2 ani primárními pDC v PBMC a nespouští tak produkci IFN- α , TNF- α a IL-6
- * u aktivovaných buněk Gen2.2 stimulovaných BKV inokulem dochází k vysokému nárůstu produkce IFN- α
- * u PBMC nezpůsobuje čistý BK virus nárůst produkce IFN- α
- * BKV infikované buňky HRPTEC jsou při kokultivaci rozpoznávány pomocí buněk Gen2.2, které produkují menší množství IFN- α a vyšší množství TNF- α
- * detekce BKV infikovaných buněk HRPTEC nastává 3-6. den po infekci
- * produkce IFN- α a TNF- α je závislá na buněčném kontaktu BKV infikovaných buněk HRPTEC s buňkami Gen2.2
- * produkce IFN- α nastává při kokultivaci buněk Gen2.2 se 100 % infikovaných buněk HRPTEC a je závislá taktéž na finálním objemu média, ve kterém jsou kokultivovány
- * k detekci BK infikovaných buněk HRPTEC pomocí buněk Gen2.2 nedojde v přítomnosti inhibitoru endosomální acidifikace

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abdul-sada, Hussein et al. 2017. "The PP4R1 Sub-Unit of Protein Phosphatase PP4 Is Essential for Inhibition of NF-KB by Merkel Polyomavirus Small Tumour Antigen." *Oncotarget* 8(15):25418–32.
- Abed, Nashwa S., Jacqueline H. Chace, Audrey L. Fleming, and John S. Cowdery. 1994. "Interferon-Gamma Regulation of B Lymphocyte Differentiation: Activation of B Cells Is a Prerequisite for IFN-Gamma-Mediated Inhibition of B Cell Differentiation." *Cellular Immunology* 153:356–66.
- Abend, Johanna R., Amy E. Joseph, Dweepanita Das, Deniz B. Campbell-cecen, and Michael J. Imperiale. 2009. "A Truncated T Antigen Expressed from an Alternatively Spliced BK Virus Early MRNA." *Journal of General Virology* 90:1238–45.
- Abend, Johanna R., Jonathan A. Low, and Michael J. Imperiale. 2010. "Global Effects of BKV Infection on Gene Expression in Human Primary Kidney Epithelial Cells." *Virology* 397(1):1–17.
- Ablasser, Andrea et al. 2013. "CGAS Produces a 2'-5'-Linked Cyclic Dinucleotide Second Messenger That Activates STING." *Nature* 498(7454):380–84.
- Adams, Dolph O. 1989. "Molecular Interactions in Macrophage Activation." *Immunology Today* 1(2):33–35.
- Akhgari, Shahla et al. 2015. "Frequency and Subtype of BK Virus Infection in Iranian Patients Infected with HIV." *Medical Microbiology and Immunology* 205(1):57–62.
- Alenquer, Marta and Maria João Amorim. 2015. "Exosome Biogenesis, Regulation, and Function in Viral Infection." *Viruses* 7:5066–83.
- An, Ping, Sáenz Robles Maria Teresa, and James M. Pipas. 2012. "Large T Antigens of Polyomaviruses : Amazing Molecular Machines." *Annual Review of Microbiology* 66:213–36.
- Anderson, James M. and Christina M. Van Itallie. 2009. "Physiology and Function of the Tight Junction." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1(2):1–16.
- Andreaskos, Evangelos, Maria Salagianni, Ioanna E. Galani, and Ourania Koltsida. 2017. "Interferon-As: Front-Line Guardians of Immunity and Homeostasis in the Respiratory Tract." *Frontiers in Immunology* 8:1–7.
- Ansari, Mairaj Ahmed et al. 2013. "Constitutive Interferon-Inducible Protein 16-Inflammasome Activation during Epstein-Barr Virus Latency I, II, and III in B and Epithelial Cells." *Journal of Virology* 87(15):8606–23.
- Assetta, Benedetta, Marco De Cecco, Bethany O. Hara, and Walter J. Atwoodb. 2016. "JC Polyomavirus Infection of Primary Human Renal Epithelial Cells Is Controlled by a Type I IFN-Induced Response." *American Society for Microbiology* 7(4):1–11.
- Bach, Erika A., Michel Aguet, and Robert D. Schreiber. 1997. "THE IFN γ RECEPTOR : A Paradigm for Cytokine Receptor Signaling." *Annual Review of Immunology* 15:563–91.
- Baetz, Andrea, Markus Frey, Klaus Heeg, and Alexander H. Dalpke. 2004. "Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS) Proteins Indirectly Regulate Toll-like Receptor Signaling in Innate Immune Cells." *Journal of Biological Chemistry* 279(52):54708–15.
- Bain, Jenny et al. 2007. "The Selectivity of Protein Kinase Inhibitors: A Further Update." *Biochemical Journal* 408(3):297–315.
- Balachandran, Siddharth, Emmanuel Thomas, and Glen N. Barber. 2004. "A FADD-Dependent Innate Immune Mechanism in Mammalian Cells." 595(1990):401–5.

- Bangham, Charles R. M. 2003. "The Immune Control and Cell-to-Cell Spread of Human T-Lymphotropic Virus Type 1." (September):3177–89.
- Behzad-behbahani, A., P. E. Klapper, P. J. Valley, G. M. Cleator, and S. H. Khoo. 2004. "Detection of BK Virus and JC Virus DNA in Urine Samples from Immunocompromised (HIV-Infected) and Immunocompetent (HIV-Non-Infected) Patients Using Polymerase Chain Reaction and Microplate Hybridisation." *Journal of Clinical Virology* 29:224–29.
- Bell, Jessica K., Janine Askins, Pamela R. Hall, David R. Davies, and David M. Segal. 2006. "The DsRNA Binding Site of Human Toll-like Receptor 3."
- Bennet, Shauna M., Linbo Zhao, and Michael J. Imperiale. 2015. "Role of a Nuclear Localization Signal on the Minor Capsid Proteins VP2 and VP3 in BKPyV Nuclear Entry." *Virology* 474:110–16.
- Binggeli, S. et al. 2007. "Polyomavirus BK-Specific Cellular Immune Response to VP1 and Large T-Antigen in Kidney Transplant Recipients." *American Journal of Transplantation* 7:1131–39.
- Blasius, A. L. et al. 2006. "Bone Marrow Stromal Cell Antigen 2 Is a Specific Marker of Type I IFN-Producing Cells in the Naive Mouse, but a Promiscuous Cell Surface Antigen Following IFN Stimulation." *The Journal of Immunology* 177(5):3260–65.
- Boldorini, Renzo et al. 2011. "Serological Evidence of Vertical Transmission of JC and BK Polyomaviruses in Humans." *Journal of General Virology* 92:1044–50.
- Botos, Istvan, David M. Segal, and David R. Davies. 2011. "The Structural Biology of Toll-like Receptors." *Structure* 19(4):447–59. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2011.02.004>).
- Bradley, Linda M., Dyana K. Dalton, and Michael Croft. 1996. "A Direct Role for IFN-Gamma in Regulation of Th1 Cell Development." *Journal of Immunology* 157(4):1350–58.
- Brincks1, Erik L., Tamara A. Kucaba, Kevin L. Legge, and Thomas S. Griffith. 2008. "Influenza-Induced Expression of Functional TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) on Human PBMC." *Hum Immunol* 69(10):319–35.
- Brown, Vivette D. and Brenda L. Gallie. 2002. "The B-Domain Lysine Patch of PRB Is Required for Binding to Large T Antigen and Release of E2F by Phosphorylation." *Molecular and Cellular Biology* 22(5):1390–1401.
- Bruni, Daniela et al. 2015. "Viral Entry Route Determines How Human Plasmacytoid Dendritic Cells Produce Type I Interferons." *Science Signaling* 8(366):1–13.
- Cao, Wei et al. 2007. "BDCA2 / FcεRIμ Complex Signals through a Novel BCR-Like Pathway in Human Plasmacytoid Dendritic Cells." *PLoS Biology* 5(10):2190–2200.
- Cao, Wei et al. 2006. "Plasmacytoid Dendritic Cell – Specific Receptor ILT7 – FcεRIμ Inhibits Toll-like Receptor – Induced Interferon Production." *Journal of Experimental Medicine* 203(6):1399–1405.
- Cao, Wei et al. 2009. "Regulation of TLR7 / 9 Responses in Plasmacytoid Dendritic Cells by BST2 and ILT7 Receptor Interaction." *Journal of Experimental Medicine* 206(7):1603–14.
- Chan, Susan H. et al. 1991. "Induction of Interferon γ Production by Natural Killer Cell Stimulatory Factor: Characterization of the Responder Cells and Synergy with Other Inducers." *Journal of Experimental Medicine* 173:869–79.
- Chan, Ying Kai and Michaela U. Gack. 2016. "Viral Evasion of Intracellular DNA and RNA Sensing." *Nature Review Microbiology* 14(6):360–73. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2016.45>).
- Chaperot, L. et al. 2006. "Virus or TLR Agonists Induce TRAIL-Mediated Cytotoxic Activity of Plasmacytoid Dendritic Cells." *The Journal of Immunology* 176(1):248–55.

- Chen, Xiaojiang S., Thilo Stehle, and Stephen C. Harrison. 1998. "Interaction of Polyomavirus Internal Protein VP2 with the Major Capsid Protein VP1 and Implications for Participation of VP2 in Viral Entry." *The EMBO Journal* 17(12):3233–40.
- Chesters, Peter M., John Heritage, and Dennis J. Mccance. 1983. "Persistence of DNA Sequences of BK Virus and JC Virus in Normal Human Tissues and in Diseased Tissues." *Journal of Infectious Diseases* 147(4):676–84.
- Chiu, Yu-Hsin, John B. MacMillan, and Zhijian J. Chen. 2009. "RNA Polymerase III Detects Cytosolic DNA and Induces Type-I Interferons Through the RIG-I Pathway." *Cell* 138(3):576–91.
- Colonna, Marco, Giorgio Trinchieri, and Yong-jun Liu. 2004. "Plasmacytoid Dendritic Cells in Immunity." *Nature Immunology* 5(12):1219–26.
- Combes, Alexis et al. 2017. "BAD-LAMP Controls TLR9 Trafficking and Signalling in Human Plasmacytoid Dendritic Cells." *Nature Communications* 8(1):1–18.
- Conjeevaram, Hari S. et al. 2006. "Peginterferon and Ribavirin Treatment in African American and Caucasian American Patients With Hepatitis C Genotype 1." *Gastroenterology* 131:470–77.
- Cotsiki, Marina et al. 2004. "Simian Virus 40 Large T Antigen Targets the Spindle Assembly Checkpoint Protein Bub1." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(4):947–52.
- Daher, K. A., M. E. Selsted, and R. I. Lehrer. 1986. "Direct Inactivation of Viruses by Human Granulocyte Defensins." *Journal of Virology* 60(3):1068–74.
- Dalianis, Tina and Hans H. Hirsch. 2013. "Human Polyomaviruses in Disease and Cancer." *Virology* 437(2):63–72.
- Das, Dweepanita, Kirk Wojno, and Michael J. Imperiale. 2008. "BK Virus as a Cofactor in the Etiology of Prostate Cancer in Its Early Stages." *Journal of Virology* 82(6):2705–14.
- Décembre, Elodie et al. 2014. "Sensing of Immature Particles Produced by Dengue Virus Infected Cells Induces an Antiviral Response by Plasmacytoid Dendritic Cells." *PLoS Pathogens* 10(10).
- Decker, Thomas, Thomas Decker, Mathias Müller, and Silvia Stockinger. 2005. "The Yin and Yang of Type I Interferon Activity in Bacterial Infection." *Nature Reviews Immunology*.
- Delbue, Serena et al. 2013. "Evidence Supporting the Association of Polyomavirus BK Genome with Prostate Cancer." *Medical Microbiology Immunity*.
- Der, S. D., A. Zhou, B. R. G. Williams, and R. H. Silverman. 1998. "Identification of Genes Differentially Regulated by Interferon Alpha, Beta, or Gamma Using Oligonucleotide Arrays." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(26):15623–28.
- Diebold, Sandra S. et al. 2003. "Viral Infection Switches Non- Plasmacytoid Dendritic Cells into High Interferon Producers." 424:324–28.
- Diner, Benjamin A., Krystal K. Lum, Jared E. Toettcher, and Ileana M. Cristea. 2016. "Viral DNA Sensors IFI16 and Cyclic GMP-AMP Synthase Possess Distinct Functions in Regulating Viral Gene Expression, Immune Defenses , and Apoptotic Responses during Herpesvirus Infection." *American Society for Microbiology* 7(6):1–15.
- Dreux, Marle`ne et al. 2012. "Short-Range Exosomal Transfer of Viral RNA from Infected Cells to Plasmacytoid Dendritic Cells Triggers Innate Immunity." *Cell Host and Microbe* 12:558–70.
- Dugan, Aisling S., Sylvia Eash, and Walter J. Atwood. 2005. "An N-Linked Glycoprotein with Alpha (2 , 3) -Linked Sialic Acid Is a Receptor for BK Virus." *Journal of Virology* 79(22):14442–45.

- Dvir, Roei et al. 2017. "IL28B Rs12979860 Genotype as a Predictor Marker of Progression to BKVirus Associated Nephropathy, after Kidney Transplantation." *Scientific Reports* 7(1):1–8.
- Dzionek, Andrzej et al. 2001. "BDCA-2 , a Novel Plasmacytoid Dendritic Cell – Specific Type II C-Type Lectin , Mediates Antigen Capture and Is a Potent Inhibitor of Interferon α/β Induction." *Journal of Experimental Medicine* 194(12):1823–34.
- Eash, Sylvia and Walter J. Atwood. 2005. "Involvement of Cytoskeletal Components in BK Virus Infectious Entry." *Journal of Virology* 79(18):11734–41.
- Evans, Vanessa A. et al. 2011. "Thymic Plasmacytoid Dendritic Cells Are Susceptible to Productive HIV-1 Infection and Efficiently Transfer R5 HIV-1 to Thymocytes in Vitro." *Retrovirology* 8(43):1–12.
- Facchetti, F., C. De Wolf-Peeters, JJ van den Oord, R. De vos, and VJ Desmet. 1988. "Plasmacytoid T Cells : A Cell Population Normally Present in the Reactive Lymph Node An Immunohistochemical and Electronmicroscopic Study." *Human Pathology* 19(9):1085–92.
- Fathallah, Ikbali et al. 2010. "EBV Latent Membrane Protein 1 Is a Negative Regulator of TLR9." *Journal of Immunology* 185:6439–47.
- Feng, Qian et al. 2012. "MDA5 Detects the Double-Stranded RNA Replicative Form in Picornavirus-Infected Cells." *Cell Reports* 2(5):1187–96.
- Feng, Zongdi et al. 2015. "Human PDCs Preferentially Sense Enveloped Hepatitis A Virions." *The Journal of Clinical Investigation* 125(1):169–76.
- Finke, Jennifer S., Michael Shodell, Kokila Shah, Frederick P. Siegal, and Ralph M. Steinman. 2004. "Dendritic Cell Numbers in the Blood of HIV-1 Infected Patients Before and After Changes in Antiretroviral Therapy." *Journal of Clinical Immunology* 24(6):647–52.
- Fioriti, D. et al. 2005. "BKV Infection and Hemorrhagic Cystitis after Allogeneic Bone Marrow Transplant." *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 18(2):309–16.
- Fitch, Frank W. 1988. "Anti-Proliferative Effect of IFN-Gamma in Immune Regulation. I. IFN-Gamma Inhibits the Proliferation of Th2 but Not Th1 Murine Helper T Lymphocyte Clones." *Journal of Immunology* 140(12):4245–52.
- Florentin, Jonathan et al. 2016. "HCV Glycoprotein E2 Is a Novel BDCA-2 Ligand and Acts as an Inhibitor of IFN Production by Plasmacytoid Dendritic Cells." *Blood* 120(23):4544–51.
- Fu, Yuxuan et al. 2017. "Exosome-Mediated MiR-146a Transfer Suppresses Type I Interferon Response and Facilitates EV71 Infection." *PLoS Pathogens* 1–31.
- Gandini, Mariana et al. 2013. "Dengue Virus Activates Membrane TRAIL Relocalization and IFN- α Production by Human Plasmacytoid Dendritic Cells In Vitro and In Vivo." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7(6).
- Gardner, S. D., E. F. D. Mackenzie, C. Smith, and A. A. Porter. 1984. "Prospective Study of the Human Polyomaviruses BK and JC and Cytomegalovirus in Renal Transplant Recipients." *Journal of Clinical Pathology* 37:578–86.
- Gardner, Sylvia D., Anne M. Field, and Dulcie V Coleman. 1971. "New Human Papovavirus (B.K.) Isolated from Urine after Renal Transplantation." *The Lancet* 1253–57.
- Gascun, Cillian F. De and Michael J. Carr. 2013. "Human Polyomavirus Reactivation : Disease Pathogenesis and Treatment Approaches." 2013.
- Ge, Dongliang et al. 2009. "Genetic Variation in IL28B Predicts Hepatitis C Treatment-Induced Viral Clearance." *Nature* 461(7262):399–401.
- Giacobbi, Nicholas S., Tushar Gupta, Andrew Coxon, and James M. Pipas. 2015. "Polyomavirus T Antigens Activate an Antiviral State." *Virology* 476:377–85.

- Goudsmit, J., P. Wertheim-van Dillen, A. Van Strien, and J. Van Der Noordaa. 1982. "The Role of BK Virus in Acute Respiratory Tract Disease and the Presence of BKV DNA in Tonsils." *Journal of Medical Virology* 10:91–99.
- Gough, Daniel J., Nicole L. Messina, Christopher J. P. Clarke, Ricky W., and David E. Johnstone-Levy. 2012. "Constitutive Type I Interferon Modulates Homeostatic Balance through Tonic Signaling." *Immunity* 36(2):166–74.
- Goutagny, Naégde et al. 2004. "Quantification and Functional Analysis of Plasmacytoid Dendritic Cells in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection." *Journal of Infectious Diseases* 189:1646–55.
- Griffith, JP, DL Griffith, I. Rayment, WT Murakami, and DL Caspar. 1992. "Inside Polyomavirus at 25-A Resolution." *Nature* 355:652–54.
- Griffiths, David A. et al. 2013. "Merkel Cell Polyomavirus Small T Antigen Targets the NEMO Adaptor Protein To Disrupt Inflammatory Signaling." *Journal of Virology* 87(24):13853–67.
- Grouard, By Géraldine et al. 1997. "The Enigmatic Plasmacytoid T Cells Develop into Dendritic." *Journal of Experimental Medicine* 185(6):1101–11.
- Guiducci, Cristiana et al. 2008. "PI3K Is Critical for the Nuclear Translocation of IRF-7 and Type I IFN Production by Human Plasmacytoid Predendritic Cells in Response to TLR Activation." *Journal of Experimental Medicine* 205(2):315–22.
- Guiducci, Cristiana et al. 2006. "Properties Regulating the Nature of the Plasmacytoid Dendritic Cell Response to Toll-like Receptor 9 Activation." *Journal of Experimental Medicine* 203(8):1999–2008.
- Hardy, A. W., D. R. Graham, G. M. Shearer, and J. P. Herbeuval. 2007. "HIV Turns Plasmacytoid Dendritic Cells (PDC) into TRAIL-Expressing Killer PDC and down-Regulates HIV Coreceptors by Toll-like Receptor 7-Induced IFN- γ ." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(44):17453–58.
- Harris, Kimya F., Joan B. Christensen, and Michael J. Imperiale. 1996. "BK Virus Large T Antigen : Interactions with the Retinoblastoma Family of Tumor Suppressor Proteins and Effects on Cellular Growth Control." *Journal of Virology* 70(4):2378–86.
- Harris, Kimya F., Joan B. Christensen, and Eric H. Radany. 1998. "Novel Mechanisms of E2F Induction by BK Virus Large-T Antigen : Requirement of Both the PRb-Binding and the J Domains." *Molecular and Cellular Biology* 18(3):1746–56.
- Hasan, Uzma A. et al. 2007. "TLR9 Expression and Function Is Abolished by the Cervical Cancer-Associated Human Papillomavirus Type 16." *Journal of Immunology* 178(5):3186–97.
- Hein, Jennifer et al. 2009. "Simian Virus 40 Large T Antigen Disrupts Genome Integrity and Activates a DNA Damage Response via Bub1 Binding." *Journal of Virology* 83(1):117–27.
- Heise, Mark T. and Herbert W. Virgin Iv. 1995. "The T-Cell-Independent Role of Gamma Interferon and Tumor Necrosis Factor Alpha in Macrophage Activation during Murine Cytomegalovirus and Herpes Simplex Virus Infections." *Journal of Virology* 69(2):904–9.
- Helle, Francois et al. 2017. "Biology of the BKPyV : An Update." *Viruses* 9:327.
- Hemann, Emily A., Johannes Schwerk, and Ram Savan. 2017. "IFN- λ 'guts' Neutrophil-Mediated Inflammation." *Nature Immunology* 18(10):1061–62.
- Henriksen, Stian, Terkel Hansen, Jack-ansgar Bruun, and Christine Hanssen Rinaldo. 2016. "The Presumed Polyomavirus Viroporin VP4 of Simian Virus 40 or Human BK Polyomavirus Is Not Required for Viral Progeny Release." *Journal of Virology* 90(22):10398–413.

- Henrique, Luiz et al. 2012. "High Prevalence of the Simultaneous Excretion of Polyomaviruses JC and BK in the Urine of HIV-Infected Patients without Neurological Symptoms in São Paulo, Brazil." *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 54(4):201–5.
- Hervas-stubbs, Sandra et al. 2011. "Direct Effects of Type I Interferons on Cells of the Immune System." *American Association for Cancer Research* 17:2619–28.
- Hesbacher, Sonja et al. 2016. "RB1 Is the Crucial Target of the Merkel Cell Polyomavirus Large T Antigen in Merkel Cell Carcinoma Cells." *Oncotarget* 7(22):32956–68.
- Hirsch, Hans H., Cinthia B. Drachenberg, Juerg Steiger, and Emilio Ramos. 2006. "Polyomavirus-Associated Nephropathy in Renal Transplantation:" Pp. 160–73 in *Polyomaviruses and Human Diseases*.
- Hirsch, Hans H. and Jürg Steiger. 2003. "Polyomavirus BK." *Lancet Infectious Diseases* 3:611–23.
- Honda, Kenya, Hideyuki Yanai, et al. 2005. "IRF-7 Is the Master Regulator of Type-I Interferone-Dependent Immune Responses." 434:772–77.
- Honda, Kenya et al. 2004. "Role of a Transductional – Transcriptional Processor Complex Involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like Receptor Signaling." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(43):15416–21.
- Honda, Kenya, Yusuke Ohba, et al. 2005. "Spatiotemporal Regulation of MyD88 – IRF-7 Signalling for Robust Type-I Interferon Induction." *Nature* 434(21):1035–40.
- Honda, Kenya and Tadatsugu Taniguchi. 2006. "IRFs : Master Regulators of Signalling by Toll-like Receptors and Cytosolic Pattern-Recognition Receptors." *Nature Reviews Immunology* 6:644–58.
- Hornung, Veit et al. 2006. "5'-Triphosphate RNA Is the Ligand for RIG-I." *Science* 314(5801):994–97.
- Hornung, Veit et al. 2004. "Replication-Dependent Potent IFN- α Induction in Human Plasmacytoid Dendritic Cells by a Single-Stranded RNA Virus." *Journal of Immunology* 173:5935–43.
- Hoshino, Katsuaki et al. 2006. "I κ B Kinase- α Is Critical for Interferon- α Production Induced by Toll-like Receptors 7 and 9." *Nature* 440(13):949–53.
- Hsiao, Chun-Yuan, Helen L. Pilmore, Zhou Lifeng, and Janak R. Zoysa. 2016. "Outcomes of Renal Transplant Recipients with BK Virus Infection and BK Virus Surveillance in the Auckland Region from 2006 to 2012." *World Journal of Nefrology* 5(6):497–506.
- Hübner, Wolfgang et al. 2009. "Quantitative 3D Video Microscopy of HIV Transfer Across T Cell Virological Synapses." *Science* 323:1743–47.
- Hurdiss, Daniel L. et al. 2016. "New Structural Insights into the Genome and Minor Capsid Proteins of BK Polyomavirus Using Cryo- Electron Microscopy." *Structure* 24:528–36.
- Ikegaya, Hiroshi et al. 2006. "Identification of a Genomic Subgroup of BK Polyomavirus Spread in European Populations." *Journal of General Virology* 87:3201–8.
- Ito, Tomoki, Holger Kanzler, Omar Duramad, Wei Cao, and Yong-Jun Liu. 2006. "Specialization , Kinetics , and Repertoire of Type 1 Interferon Responses by Human Plasmacytoid Predendritic Cells." *Blood* 107(6):2423–32.
- Ivashkiv, Lionel and Laura T. Donlin. 2014. "Regulation of Type I Interferon Responses." *Nature Review Immunology* 14(1):36–49.
- Izaguirre, Alexander et al. 2003. "Comparative Analysis of IRF and IFN-Alpha Expression in Human Plasmacytoid and Monocyte-Derived Dendritic Cells." *Journal of Leukocyte Biology* 74:1125–38.

- Janovec, Vaclav et al. 2018. "The MEK1/2-ERK Pathway Inhibits Type I IFN Production in Plasmacytoid Dendritic Cells." *Frontiers in Immunology* 9(FEB):1–16.
- Jeffers, Liesl K., Vicki Madden, and Jennifer Webster-Cyriaque. 2009. "BK Virus Has Tropism for Human Salivary Gland Cells in Vitro : Implications for Transmission." *Virology* 394:183–93.
- Jiang, Mengxi, Johanna R. Abend, Billy Tsai, and Michael J. Imperiale. 2009. "Early Events during BK Virus Entry and Disassembly." *Journal of Virology* 83(3):1350–58.
- Jin, Jing, Nathan M. Sherer, Gisela Heidecker, David Derse, and Walther Mothes. 2009. "Assembly of the Murine Leukemia Virus Is Directed towards Sites of Cell – Cell Contact." 7(7).
- Jin, Li, Patricia E. Gibson, James C. Booth, and Jonathan P. Clewley. 1993. "Genomic Typing of BK Virus in Clinical Specimens by Direct Sequencing of Polymerase Chain Reaction Products." *Journal of Medical Virology* 41:11–17.
- Jin, Li, Patricia E. Gibson, Wendy A. Knowles, and Jonathan P. Clewley. 1993. "BK Virus Antigenic Variants: Sequence Analysis Within the Capsid VP1 Epitope." *Journal of Medical Virology* 39:50–56.
- Johannessen, Mona, Marit Renée Myhre, Marte Dragset, Conny Tümmler, and Ugo Moens. 2008. "Phosphorylation of Human Polyomavirus BK Agnoprotein at Ser-11 Is Mediated by PKC and Has an Important Regulative Function." *Virology* 379:97–109.
- Ju, Xinsheng, Martin Zenke, Derek N. J. Hart, and Georgina J. Clark. 2016. "CD300a/c Regulate Type I Interferon and TNF- α Secretion by Human Plasmacytoid Dendritic Cells Stimulated with TLR7 and TLR9 Ligands." *Blood* 112(4):1184–95.
- Kahan, Allayne V, Dulcie V Coleman, and Leopold G. Koss. 1980. "Activation of Human Polyomavirus Infection — Detection by Cytologic Technics." *American Society of Clinical Pathologists* 74(3):326–32.
- Kalamvoki, Maria, Te Du, and Bernard Roizman. 2014. "Cells Infected with Herpes Simplex Virus 1 Export to Uninfected Cells Exosomes Containing STING, Viral MRNAs, and MicroRNAs." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 4991–96.
- Kang, Dong-chul et al. 2002. "Mda-5 : An Interferon-Inducible Putative RNA Helicase with Double-Stranded RNA-Dependent ATPase Activity and Melanoma Growth-Suppressive Properties." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(2):637–42.
- Kato, Hiroki et al. 2005. "Cell Type-Specific Involvement of RIG-I in Antiviral Response." *Immunity* 23:19–28.
- Kato, Hiroki et al. 2006. "Differential Roles of MDA5 and RIG-I Helicases in the Recognition of RNA Viruses." 441:101–5.
- Katona, Ildy M., Timothy R. Mosmann, and Robert L. Coffman. 1988. "IFN-Gamma Regulates the Isotypes of Ig Secreted during in Vivo Humoral Immune Responses." *Journal of Immunology* 140(4):1022.
- Kawai, Taro et al. 2004. "Interferon- α Induction through Toll-like Receptors Involves a Direct Interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6." *Nature Immunology* 5(10):1061–68.
- Kawai, Taro et al. 2005. "IPS-1, an Adaptor Triggering RIG-I- and Mda5-Mediated Type I Interferon Induction." *Nature Immunology* 6(10):981–88.
- Kawai, Taro and Shizuo Akira. 2007. "Antiviral Signaling Through Pattern Recognition Receptors." *Journal of Biochemistry* 141:137–45.
- Kenan, Daniel et al. 2017. "BK Polyomavirus Genomic Integration and Large T Antigen Expression: Evolving Paradigms in Human Oncogenesis." *American Journal of Transplantation* 17(6):1674–80.

- Kenan, Daniel J., Piotr A. Mieczkowski, Raquel Burger-calderon, Harsharan K. Singh, and Volker Nicleleit. 2015. "The Oncogenic Potential of BK-Polyomavirus Is Linked to Viral Integration into the Human Genome." *Journal of Pathology* 273:379–89.
- Kerkmann, Miren et al. 2005. "Spontaneous Formation of Nucleic Acid-Based Nanoparticles Is Responsible for High Interferon- α Induction by CpG-A in Plasmacytoid Dendritic Cells." *Journal of Biological Chemistry* 280(9):8086–93.
- Khalil, Kamel, Ilker Kudret Sariyer, and Mahmut Safak. 2008. "Small Tumor Antigen of Polyomaviruses: Role in Viral Life Cycle and Cell Transformation." *Journal of Cell Physiology* 215(2):309–19.
- Khar, Umair Tahir, Radu Tanasescu, and Cris S. Constantinescu. 2015. "PEGylated IFN β -1a in the Treatment of Multiple Sclerosis." *Expert Opinion on Biological Therapy* 15(7):1–8.
- Kieffer, Tara L. et al. 2007. "Telaprevir and Pegylated Interferon- α 2a Inhibit Wild-Type and Resistant Genotype 1 Hepatitis C Virus Replication in Patients." *Hepathology* 46:631–39.
- Kim, Sarah et al. 2014. "Self-Priming Determines High Type I IFN Production by Plasmacytoid Dendritic Cells." *European Journal of Immunology* 44(3):807–18.
- Kim, You Me, Melanie M. Brinkmann, Marie Eve Paquet, and Hidde L. Ploegh. 2008. "UNC93B1 Delivers Nucleotide-Sensing Toll-like Receptors to Endolysosomes." *Nature* 452(7184):234–38.
- Kingham, T. Peter et al. 2007. "Murine Liver Plasmacytoid Dendritic Cells Become Potent Immunostimulatory Cells After Flt-3 Ligand Expansion." *Hepathology* 45(2):445–54.
- Kitagawa, Yoshinori, Madoka Sakai, Mariko Funayama, Masae Itoh, and Bin Gotoh. 2017. "Human Metapneumovirus M2-2 Protein Acts as a Negative Regulator of Alpha Interferon Production by Plasmacytoid Dendritic Cells." *Journal of Virology*.
- Knowles, Wendy A. et al. 2003. "Population-Based Study of Antibody to the Human Polyomaviruses BKV and JCV and the Simian Polyomavirus SV40." *Journal of Medical Virology* 71:115–23.
- Komuro, A. and C. M. Horvath. 2006. "RNA- and Virus-Independent Inhibition of Antiviral Signaling by RNA Helicase LGP2." *Journal of Virology* 80(24):12332–42.
- Lee, HK, JM Lund, B. Ramanathan, N. Mizushima, and A. Iwasaki. 2007. "Autophagy-Dependent Viral Recognition by Plasmacytoid Dendritic Cells." *Science* 315:1398–1401.
- Lepelley, Alice et al. 2011. "Innate Sensing of HIV-Infected Cells." *PLoS Pathogens* 7(2):1–15.
- Li, Hui, Padmaja Gade, Weihua Xiao, and Dhan V. Kalvakolanu. 2007. "The Interferon Signaling Network and Transcription Factor C/EBP- β ." *Cellular and Molecular Biology* 4(6):407–18.
- Li, Xiao-dong, Lijun Sun, Rashu B. Seth, Gabriel Pineda, and Zhijian J. Chen. 2005. "Hepatitis C Virus Protease NS3[–]4A Cleaves Mitochondrial Antiviral Signaling Protein off the Mitochondria to Evade Innate Immunity." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(49):17717–22.
- Liu, Juan, Cen Zhang, Wenwei Hu, and Zhaohui Feng. 2014. "Tumor Suppressor P53 and Its Mutants in Cancer Metabolism." *Cancer Letters* 356(2):197–203.
- Low, Jonathan A., Brian Magnuson, Billy Tsai, and Michael J. Imperiale. 2006. "Identification of Gangliosides GD1b and GT1b as Receptors for BK Virus." *Journal of Virology* 80(3):1361–66.
- Low, Jonathan, H. David Humes, Mark Szczypka, and Michael Imperiale. 2004. "BKV and SV40 Infection of Human Kidney Tubular Epithelial Cells in Vitro." *Virology* 323:182–88.
- Machado, Daisy Maria et al. 2011. "Human Polyomaviruses JC and BK in the Urine of Brazilian Children and Adolescents Vertically Infected by HIV." *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 106(8):931–35.

- Major, Eugene and Giampiero D. I. Mayorca. 1973. "Malignant Transformation of BHK21 Clone 13 Cells by BK Virus-A Human Papovavirus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70(11):3210–12.
- Malmgaard, Lene, Thais P. Salazar-mather, Casey A. Lewis, and Christine A. Biron. 2002. "Promotion of Alpha / Beta Interferon Induction during In Vivo Viral Infection through Alpha / Beta Interferon Receptor / STAT1 System-Dependent and -Independent Pathways." *Journal of Virology* 76(9):4520–25.
- Markowitz, Rhea-beth, Harry C. Thompson, Jane F. Mueller, Jeffrey A. Cohen, and William S. Dynan. 2016. "Incidence of BK Virus and JC Virus Viruria in Human Immunodeficiency Virus-Infected and -Uninfected Subjects." *Journal of Infectious Diseases* 167(1):13–20.
- Martinelli, Elena et al. 2007. "HIV-1 Gp120 Inhibits TLR9-Mediated Activation and IFN- α Secretion in Plasmacytoid Dendritic Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(9):3396–3401.
- Mathan, Till S. M., Carl G. Figdor, and Sonja I. Buschow. 2013. "Human Plasmacytoid Dendritic Cells : From Molecules to Intercellular Communication Network." *Frontiers in Immunology* 4:1–17.
- Mccabe, M. T., J. A. Low, M. J. Imperiale, and M. L. Day. 2006. "Human Polyomavirus BKV Transcriptionally Activates DNA Methyltransferase 1 through the PRb / E2F Pathway." *Oncogene* 25:2727–35.
- Mckenna, Kelli, Anne-sophie Beignon, and Nina Bhardwaj. 2005. "Plasmacytoid Dendritic Cells : Linking Innate and Adaptive Immunity." *Journal of Virology* 79(1):17–27.
- McNab, Finlay, Katrin Mayer-barber, Alan Sher, Andreas Wack, and Anne O. Garra. 2015. "Type I Interferons in Infectious Disease." *Nature Publishing Group* 15(2):87–103.
- Medrano, Ruan F. V, Aline Hunger, Samir Andrade Mendonça, José Alexandre M, and Bryan E. Strauss. 2017. "Immunomodulatory and Antitumor Effects of Type I Interferons and Their Application in Cancer Therapy." *Oncotarget* 8(41):71249–84.
- Mestan, J. et al. 1986. "Antiviral Effects of Recombinant Tumour Necrosis Factor in Vitro." *Nature* 323(6091):816–19.
- Meyer-wentrup, Friederike et al. 2016. "Targeting DCIR on Human Plasmacytoid Dendritic Cells Results in Antigen Presentation and Inhibits IFN- α Production." *Blood* 111(8):4245–54.
- Miyamoto, Rie et al. 2010. "Inhibitor of I κ B Kinase Activity, BAY 11-7082, Interferes with Interferon Regulatory Factor 7 Nuclear Translocation and Type I Interferon Production by Plasmacytoid Dendritic Cells." *Arthritis Research & Therapy* 12(3):1–13.
- Moriyama, Takahito, J. Pablo Marquez, Tetsuro Wakatsuki, and Andrey Sorokin. 2007. "Caveolar Endocytosis Is Critical for BK Virus Infection of Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells." *Journal of Virology* 81(16):8552–62.
- Nakshatri, Harikrishna, Mary M. Pater, and Alan Pater. 1988. "Functional Role of BK Virus Tumor Antigens Transformation." *Journal of Virology* 62(12):4613–21.
- Novick, Daniela, Batya Cohen, and Menachem Rubinstein. 1994. "The Human Interferon α/β Receptor : Characterization and Molecular Cloning." *Cell* 77:391–400.
- Okada, Yuki et al. 2005. "Dissociation of Heterochromatin Protein 1 from Lamin B Receptor Induced by Human Polyomavirus Agnoprotein : Role in Nuclear Egress of Viral Particles." *EMBO Reports* 6(5):452–57.
- Osawa, Youko et al. 2006. "Collaborative Action of NF-KB and P38 MAPK Is Involved in CpG DNA-Induced IFN- α and Chemokine Production in Human Plasmacytoid Dendritic Cells." *Journal of Immunology* 177:4841–52.

- Osborn, L., S. Kunkel, and G. J. Nabel. 1989. "Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin 1 Stimulate the Human Immunodeficiency Virus Enhancer by Activation of the Nuclear Factor Kappa B." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(7):2336–40.
- Padgett, Billie L., Gabriele M. Zurhein, Duard L. Walker, Robert J. Eckroade, and Bert H. Dessel. 1971. "Cultivation of Papova-like Virus from Human Brain with Progressive Multifocal Leucoencephalopathy." *The Lancet* 1:1257–60.
- Pallas, David C. et al. 1990. "Polyoma Small and Middle T Antigens and SV40 Small t Antigen Form Stable Complexes with Protein Phosphatase 2A." *Cell* 60:167–76.
- Paolicelli, Damiano, Vita Drenzo, and Maria Trojano. 2009. "Review of Interferon Beta-1b in the Treatment of Early and Relapsing Multiple Sclerosis." *Biologics* 3:369–76.
- Park, Boyoun et al. 2009. "Proteolytic Cleavage in an Endolysosomal Compartment Is Required for Toll-like Receptor 9 Activation." *Nature Immunology* 9(12):1407–14.
- Pauls, Eduardo et al. 2012. "Essential Role for IKKB in Production of Type 1 Interferons by Plasmacytoid Dendritic Cells." *Journal of Biological Chemistry* 287(23):19216–28.
- Paz, S. et al. 2006. "Induction of IRF-3 and IRF-7 Phosphorylation Following Activation of the RIG-I Pathway." *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand)* 52(1):17–28.
- Pertsovskaya, Inna, Elena Abad, Núria Domedel-puig, Jordi Garcia-ojalvo, and Pablo Villoslada. 2013. "Transient Oscillatory Dynamics of Interferon Beta Signaling in Macrophages." *BMC Systems Biology* 7(59):1–12.
- Pestka, Sidney, Christopher D. Krause, and Mark R. Walter. 2004. "Interferons, Interferon-like Cytokines, and Their Receptors." *Immunological Reviews* 202:8–32.
- Pfaffer, Christian K. and Karl-klaus Conzelmann. 2008. "Measles Virus V Protein Is a Decoy Substrate for I κ B Kinase α and Prevents Toll-Like Receptor 7 / 9-Mediated Interferon Induction." *Journal of Virology* 82(24):12365–73.
- Pichlmair, Andreas et al. 2006. "RIG-I-Mediated Antiviral Responses to Single-Stranded RNA Bearing 5'-Phosphates." *Science* 314(5801):997–1001.
- Portolani, Marinella, Giuseppe Barbanti-brodano, and Michele La Placa. 1975. "Malignant Transformation of Hamster Kidney Cells by BK Virus." *Journal of Virology* 15(2):420–22.
- Ramakrishnaiah, Vedashree et al. 2013. "Exosome-Mediated Transmission of Hepatitis C Virus." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(32):13109–13.
- Rayment, I., T. S. Baker, and D. L. .. Caspar. 1982. "Polyoma Virus Capsid Structure at 22.5 Å Resolution." *Nature* 295(5845):110–15.
- Renée, Marit, Gunn-hege Olsen, Rainer Gosert, Hans H. Hirsch, and Christine Hanssen Rinaldo. 2010. "Clinical Polyomavirus BK Variants with Agnogene Deletion Are Non-Functional but Rescued by Trans-Complementation." *Virology* 398:12–20.
- Ribeiro, Andrea et al. 2012. "Activation of Innate Immune Defense Mechanisms Contributes to Polyomavirus BK-Associated Nephropathy." *Kidney International* 81(1):100–111.
- Ribeiro, Andrea et al. 2016. "BK Virus Infection Activates the TNF α /TNF Receptor System in Polyomavirus-Associated Nephropathy." *Molecular and Cellular Biochemistry* 411(1–2):191–99.
- Rijckborst, Vincent and Harry L. A. Janssen. 2010. "The Role of Interferon in Hepatitis B Therapy." *Current Hepatitis Reports* 9:231–38.
- Rinaldo, Christine Hanssen, Terje Traavik, and Allan Hey. 1998. "The Agnogene of the Human Polyomavirus BK Is Expressed." *Journal of Virology* 72(7):6233–36.

- Ripple, Michael J. et al. 2014. "Activation of C-Myc and Cyclin D1 by JCV T-Antigen and β -Catenin in Colon Cancer." *PLoS ONE* 9(9):1–11.
- Rothenfusser, Simon et al. 2005. "The RNA Helicase Lgp2 Inhibits TLR-Independent Sensing of Viral Replication by Retinoic Acid-Inducible Gene-1." *Journal of Immunology* 175(8):5260–68.
- Rua, Réjane, Alice Lepelley, Antoine Gessain, and Olivier Schwartz. 2012. "Innate Sensing of Foamy Viruses by Human Hematopoietic Cells." *Journal of Virology* 86(2):909–18.
- Sabbah, Ahmed et al. 2010. "Activation of Innate Immune Antiviral Response by NOD2." *Nature Immunology* 10(10):1073–80.
- Saha, Supriya K. et al. 2006. "Regulation of Antiviral Responses by a Direct and Specific Interaction between TRAF3 and Cardif." *The EMBO Journal* 25(14):3257–63.
- Saito, Takeshi et al. 2007. "Regulation of Innate Antiviral Defenses through a Shared Repressor Domain in RIG-I and LGP2." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(2):582–87.
- Sasai, Miwa, Melissa M. Linehan, and Akiko Iwasaki. 2010. "Bifurcation of Toll-like Receptor 9 Signaling by Adaptor Protein 3." *Science* 329(5998):1530–34.
- Satoh, T. et al. 2010. "LGP2 Is a Positive Regulator of RIG-I- and MDA5-Mediated Antiviral Responses." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(4):1512–17.
- Scharton, Tanya M. and Phillip Scott. 1993. "Natural Killer Cells Are a Source of Interferon μ That Drives Differentiation of CD4 + T Cell Subsets and Induces Early Resistance to Leishmania Major in Mice." *Journal of Experimental Medicine* 178:567–77.
- Schlender, Jorg et al. 2005. "Inhibition of Toll-Like Receptor 7- and 9-Mediated Alpha / Beta Interferon Production in Human Plasmacytoid Dendritic Cells by Respiratory Syncytial Virus and Measles Virus." *Journal of Virology* 79(9):5507–15.
- Schmidt, Barbara, Brittany M. Ashlock, Hillary Foster, Sue H. Fujimura, and Jay A. Levy. 2005. "HIV-Infected Cells Are Major Inducers of Plasmacytoid Dendritic Cell Interferon Production, Maturation, and Migration." *Virology* 343(2):256–66.
- Schuchner, Stefan and Erhard Wintersberger. 1999. "Binding of Polyomavirus Small T Antigen to Protein Phosphatase 2A Is Required for Elimination of P27 and Support of S-Phase Induction in Concert with Large T Antigen." *Journal of Virology* 73(11):9266–73.
- Schuster, Philipp et al. 2010. "Co-Ordinated Regulation of Plasmacytoid Dendritic Cell Surface Receptors upon Stimulation with Herpes Simplex Virus Type 1." *Immunology* 129(2):234–47.
- Seif, Isabelle, George Khoury, and Ravi Dhar. 1979. "The Genome of Human Papovavirus BKV." *Cell* 18:963–77.
- Seo, Sang Heui and Robert G. Webster. 2002. "Tumor Necrosis Factor Alpha Exerts Powerful Anti-Influenza Virus Effects in Lung Epithelial Cells." *Journal of Virology* 76(3):1071–76. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=135862&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Sercan, Özen, Diana Stoycheva, Günter J. Hämmerling, Bernd Arnold, and Thomas Schüler. 2010. "IFN- γ Receptor Signaling Regulates Memory CD8 + T Cell Differentiation." *Journal of Immunology* 184(6):2855–62.
- Seshacharyulu, Parthasarathy Pandey, Poomy, Kaustubh Datta, and Surinder K. Batra. 2013. "Phosphatase: PP2A Structural Importance, Regulation and Its Aberrant Expression in Cancer." *Cancer Letters* 335(1):9–18.

- Shahzad, Naveed et al. 2013. "The T Antigen Locus of Merkel Cell Polyomavirus Downregulates Human Toll-Like Receptor 9 Expression." *Journal of Virology* 87(23):13009–19.
- Sherer, Nathan M., Maik J. Lehmann, Luisa F. Jimenez-soto, Marc Pypaert, and Walther Mothes. 2009. "Retroviruses Can Establish Filopodial Bridges for Efficient Cell-to-Cell Transmission." *Nature Cell Biology* 9(3):310–15.
- Shinohara, Mari L. et al. 2006. "Osteopontin Expression Is Essential for Interferon- α Production by Plasmacytoid Dendritic Cells." *Nature Immunology* 7(5):498–506.
- Siegal, FP et al. 1999. "The Nature of Principal Type I Interferon-Producing Cells in Human Blood." *Science* 284(5421):1835–37.
- Slate, B. Y. Doris L. et al. 1982. "Chromosomal Location of α Interferon Family." *Journal of Experimental Medicine* 155(April):1019–24.
- Sommerey, Caroline, Sophie Paul, Peter Staeheli, and Thomas Michiels. 2008. "IFN-Lambda (IFN- λ) Is Expressed in a Tissue-Dependent Fashion and Primarily Acts on Epithelial Cells In Vivo." *PLoS Pathogens* 4(3):1–12.
- Soumelis, V. and Y-j Liu. 2006. "From Plasmacytoid to Dendritic Cell: Morphological and Functional Switches during Plasmacytoid Pre-Dendritic Cell Differentiation." *European Journal of Immunology* 36:2286–92.
- Sourisseau, M., N. Sol-Foulon, F. Porrot, F. Blanchet, and O. Schwartz. 2007. "Inefficient Human Immunodeficiency Virus Replication in Mobile Lymphocytes." *Journal of Virology* 81(2):1000–1012.
- Steinhagen, Folkert et al. 2013. "IRF-5 and NF-KB P50 Co-Regulate IFN- β and IL-6 Expression in TLR9-Stimulated Human Plasmacytoid Dendritic Cells Folkert." 43(7):1896–1906.
- Stubdal, Hilde et al. 1997. "Inactivation of PRB-Related Proteins P130 and P107 Mediated by the J Domain of Simian Virus 40 Large T Antigen." *Molecular and Cellular Biology* 17(9):4979–90.
- Sullivan, Christopher S., Paul Cantalupo, and James M. Pipas. 2000. "The Molecular Chaperone Activity of Simian Virus 40 Large T Antigen Is Required To Disrupt Rb-E2F Family Complexes by an ATP-Dependent Mechanism." *Molecular and Cellular Biology* 20(17):6233–43.
- Sun, Lijun et al. 2013. "Cyclic GMP-AMP Synthase Is a Cytosolic DNA Sensor That Activates the Type I Interferon Pathway." *Science* 339(6121).
- Swiecki, Melissa et al. 2011. "Type I Interferon Negatively Controls Plasmacytoid Dendritic Cell Numbers in Vivo." *Journal of Experimental Medicine* 208(12):2367–74.
- Swiecki, Melissa and Marco Colonna. 2015. "The Multifaceted Biology of Plasmacytoid Dendritic Cells." *Nature Review Immunology* 15(8):471–85.
- Syedbasha, Mohammedyaseen and Adrian Egli. 2017. "Interferon Lambda: Modulating Immunity in Infectious Diseases." *Frontiers in Immunology* 8:1–16.
- Tailor, Prafullakumar et al. 2007. "Type I Interferon Induction in Dendritic Cells Requires IRF-8 That Effects the Feedback Phase of Transcription." *Immunity* 27(2):228–39.
- Takahashi, Ken et al. 2006. "Cutting Edge: Roles of Caspase-8 and Caspase-10 in Innate Immune Responses to Double-Stranded RNA." *Journal of Immunology* 176:4520–24.
- Takahashi, Ken et al. 2010. "Plasmacytoid Dendritic Cells Sense Hepatitis C Virus-Infected Cells, Produce Interferon, and Inhibit Infection." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(16):7431–36.
- Takahito, Moriyama and Andrey Sorokin. 2008. "Intracellular Trafficking Pathway of BK Virus in Human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells." *Virology* 371(2):336–49.

- Takeuchi, Osamu and Shizuo Akira. 2017. "Innate Immunity to Virus Infection." *Immunology Reviews* 227(1):75–86.
- Tel, Jurjen et al. 2012. "Human Plasmacytoid Dendritic Cells Efficiently Cross-Present Exogenous Ags to CD8+ T-Cells, despite Lower Ag Uptake than Myeloid Dendritic Cell Subsets." *Blood* 121(3):459–67.
- Théry, Clotilde, Matias Ostrowski, and Elodie Segura. 2009. "Membrane Vesicles as Conveyors of Immune Responses." *Nature Reviews Immunology* 9(8):581–93.
- Tognon, Mauro, Alfredo Corallini, Fernanda Martini, Massimo Negrini, and Giuseppe Barbanti-brodano. 2003. "Oncogenic Transformation by BK Virus and Association with Human Tumors." *Oncogene* 22:5192–5200.
- Topalis, D., G. Andrei, and R. Snoeck. 2013. "The Large Tumor Antigen : A "Swiss Army Knife" Protein Possessing the Functions Required for the Polyomavirus Life Cycle." *Antiviral Research* 97(2):122–36.
- Tsunetsugu-yokota, Yasuko and Mahmod Muhsen. 2013. "Development of Human Dendritic Cells and Their Role in HIV Infection : Antiviral Immunity versus HIV Transmission." *Frontiers in Immunology* 4:1–10.
- Uematsu, Satoshi et al. 2005. "Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase-1 Plays an Essential Role for Toll-like Receptor (TLR) 7- and TLR9-Mediated Interferon- α Induction." *Journal of Experimental Medicine* 201(6):915–23.
- Umbro, Ilaria et al. 2016. "Different Behaviour of BK-Virus Infection in Liver Transplant Recipients." *World Journal of Gastroenterology* 22(4):1532–40.
- Varani, S. et al. 2007a. "Human Cytomegalovirus Differentially Controls B Cell and T Cell Responses through Effects on Plasmacytoid Dendritic Cells." *The Journal of Immunology* 179(11):7767–76.
- Varani, S. et al. 2007b. "Human Cytomegalovirus Differentially Controls B Cell and T Cell Responses through Effects on Plasmacytoid Dendritic Cells." *The Journal of Immunology* 179(11):7767–76.
- Venkataraman, T. et al. 2007. "Loss of DEXD/H Box RNA Helicase LGP2 Manifests Disparate Antiviral Responses." *The Journal of Immunology* 178(10):6444–55.
- Vincent, Isabelle E. et al. 2011. "Hepatitis B Virus Impairs TLR9 Expression and Function in Plasmacytoid Dendritic Cells." *PLoS ONE* 6(10):1–12.
- Wang, Ting, Liurong Fang, Fuwei Zhao, Dang Wang, and Shaobo Xiao. 2017. "Exosomes Mediate Intercellular Transmission of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV)." *Journal of Virology* 90(4):1734–17.
- Weerd, Nicole A. De and Thao Nguyen. 2012. "The Interferons and Their Receptors — Distribution and Regulation." *Immunology and Cell Biology* 90(5):483–91.
- Wieland, S. F. et al. 2014. "Human Plasmacytoid Dendritic Cells Sense Lymphocytic Choriomeningitis Virus-Infected Cells In Vitro." *Journal of Virology* 88(1):752–57.
- Wilson, Sarah S., Mayim E. Wiens, and Jason G. Smith. 2013. "Antiviral Mechanisms of Human Defensins." *Journal of Molecular Biology* 425(24).
- Wu, J. H., R. A. Simonette, H. P. Nguyen, P. L. Rady, and S. K. Tying. 2016. "Small T-Antigen of the TS-Associated Polyomavirus Activates Factors Implicated in the MAPK Pathway." *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 30:1025–67.
- Wu, Pingping et al. 2008. "TLR9 / TLR7-Trigged Downregulation of BDCA2 Expression on Human Plasmacytoid Dendritic Cells from Healthy Individuals and Lupus Patients." *Clinical Immunology* 129:40–48.

- Xu, Yongfen et al. 2009. "HBsAg Inhibits TLR9-Mediated Activation and IFN- α Production in Plasmacytoid Dendritic Cells." *Molecular Immunology* 46:2640–46.
- Yamaguchi, Mayu, Yoshinori Kitagawa, Min Zhou, Masae Itoh, and Bin Gotoh. 2014. "An Anti-Interferon Activity Shared by Paramyxovirus C Proteins : Inhibition of Toll-like Receptor 7 / 9-Dependent Alpha Interferon Induction." *FEBS Letters* 588(1):28–34.
- Yang, Kun et al. 2005. "Human TLR-7-, -8-, and -9-Mediated Induction of IFN- α/β and - λ Is IRAK-4 Dependent and Redundant for Protective Immunity to Viruses." *Immunity* 23(5):465–78.
- Yang, Yinli et al. 2017. "Exosomes Mediate Hepatitis B Virus (HBV) Transmission and NK-Cell Dysfunction." *Cellular and Molecular Biology* 14(5):465–75.
- Yin, Zhiwei et al. 2012. "Type III IFNs Are Produced by and Stimulate Human Plasmacytoid Dendritic Cells." *Journal of Immunology* 189:2735–45.
- Yoneyama, Mitsutoshi et al. 2004. "The RNA Helicase RIG-I Has an Essential Function in Double-Stranded RNA-Induced Innate Antiviral Responses." *Nature Immunology* 5(7):730–37.
- Zhao, Linbo, Anthony T. Marciano, Courtney R. Rivet, and Michael J. Imperiale. 2016. "Caveolin- and Clathrin-Independent Entry of BKPyV into Primary Human Proximal Tubule Epithelial Cells." *Virology* 492:66–72.
- Zhou, Zhenyuan et al. 2016. "Phenotypic and Functional Alterations of PDCs in Lupus-Prone Mice." *Scientific Reports* 16(6):1–11.
- Zhu, Xun et al. 2015. "IFITM3-Containing Exosome as a Novel Mediator for Anti-Viral Response in Dengue Virus Infection." *Cellular Microbiology* 17(1):105–18.